



**CARLA ISABEL
SOARES BATISTA**

**REGULAÇÃO DOS NÍVEIS DE GDNF NA
SUBSTANTIA NIGRA PELO ESTRADIOL**



**CARLA ISABEL
SOARES BATISTA**

**REGULAÇÃO DOS NÍVEIS DE GDNF NA
SUBSTANTIA NIGRA PELO ESTRADIOL**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Graça Maria Fernandes Baltazar, Professora Auxiliar na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior e co-orientação da Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves, Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Apoio financeiro da FCT e do FEDER
no âmbito do III Quadro Comunitário de
Apoio (Programa POCI 2010).

o júri

presidente

Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira

Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

orientador

Doutora Graça Maria Fernandes Baltazar

Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior

co-orientador

Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves

Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

arguente

Doutora Emília da Conceição Pedrosa Duarte

Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

agradecimentos

A realização deste trabalho envolveu directa ou indirectamente várias pessoas às quais não posso deixar de expressar os meus profundos agradecimentos:

À Prof. Doutora Graça Baltazar, orientadora deste trabalho, dirijo o meu profundo agradecimento. A sua orientação foi exemplar não só ao longo do trabalho experimental como na sua redacção. Agradeço o seu empenho e interesse neste trabalho. Os seus ensinamentos foram o ponto-chave para compreender muitos conceitos e despertar a curiosidade de saber mais. O meu muito obrigada.

À Prof. Doutora Paula Gonçalves, co-orientadora, agradeço o seu interesse e preocupação no desenrolar dos trabalhos. A sua revisão crítica e conselhos foram muito úteis no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Doutora Carla Fonseca, à Dr.^a Filipa Campos, à Mestre Ana Clara Cristóvão, à Dr.^a Catarina Ferreira e ao Jorge Ferreira quero agradecer o envolvimento que tiveram e a preciosa ajuda que me deram neste trabalho.

Ao Prof. Doutor Luís de Almeida agradeço a sua disponibilidade, transmissão de conhecimentos e acompanhamento indispensáveis à realização deste trabalho.

A toda o pessoal do CICS da Faculdade de Ciência da Saúde da universidade da Beira Interior o meu obrigada por me acolherem na vossa instituição.

Aos meus colegas do mestrado o meu muito obrigada por me proporcionarem um ano fabuloso. Jamais irão cair no esquecimento. Aos docentes da UA que durante o ano curricular partilharam connosco os seus conhecimentos.

Para finalizar, gostaria de expressar um sentimento especial para com a minha família e pedir desculpa aos meus Rui, Afonso e Henrique pelos prolongados tempos de ausência no decorrer da realização deste trabalho e agradecer toda a vossa compreensão. Aos meus pais, à minha irmã e à minha tia Cristina agradeço o conforto e a motivação que me deram nos momentos mais difíceis.

Do fundo do coração o meu muito obrigada a todas as pessoas aqui mencionadas.

palavras-chave

Estradiol, GDNF, *substantia nigra*, L-DOPA, H₂O₂, doença de Parkinson, 6-OHDA, neuroprotecção.

resumo

O stress oxidativo ao nível da via nigroestriatal é reconhecido como uma das causas da degeneração dos neurónios dopaminérgicos da *substantia nigra* na doença de Parkinson (DP), sendo o efeito protector do estradiol recorrentemente associado à protecção contra o stress oxidativo. A acção protectora do estradiol na via nigroestriatal pode ainda envolver outros efeitos, tais como modulação da expressão de factores neurotróficos cuja capacidade de promover a sobrevivência neuronal é sobejamente conhecida. Neste trabalho analisámos a regulação dos níveis do factor neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF) pelo 17 β -estradiol na *substantia nigra* e determinámos qual a contribuição específica deste efeito para a acção neuroprotectora da hormona. Adicionalmente, estudámos a modulação do efeito do 17 β -estradiol na expressão de GDNF por agentes oxidantes, levodopa (L-DOPA) e H₂O₂. Para determinar os níveis de GDNF procedemos a análise de Western-Blot em extractos de células pós-natais de *substantia nigra* em cultura após incubação com 17 β -estradiol. Realizámos estudos *in vivo* para determinar de que forma o 17 β -estradiol afecta a acção da toxina dopaminérgica 6-hidroxidopamina (6-OHDA), quer ao nível da viabilidade das células dopaminérgicas, como ao nível da expressão dos níveis de GDNF. Os resultados obtidos permitiram concluir que, em células pós-natais de *substantia nigra* em cultura, o 17 β -estradiol promoveu o incremento da expressão do GDNF pelos astrócitos, provavelmente via ligação a receptores membranares. Verificámos ainda que os efeitos do estradiol parecem ser potenciados pela exposição a L-DOPA e H₂O₂. *In vivo*, o estradiol protegeu as células dopaminérgicas da *substantia nigra* da lesão causada por 6-OHDA, possivelmente através da estimulação da síntese de GDNF observada nestas condições.

keywords

Estradiol, GDNF, *substantia nigra*, L-DOPA, H₂O₂, Parkinson disease, 6-OHDA, neuroprotection, oxidative stress.

abstract

Estradiol is currently considered a neuroprotector agent of nigral dopaminergic neurons. Oxidative stress in the nigrostriatal pathway has been associated with the development of Parkinson disease and the protective effect of estradiol is thought to be associated with a defence against oxidative stress. The protection promoted by estradiol in nigrostriatal pathway may also be coupled to the expression of neurotrophic factors, molecules recognized by its capability to promote neuron survival. In this study we analysed how 17 β -estradiol regulates nigral glial cell line deriv GDNF levels and evaluated the contribution of this effect to the neuroprotective action of this hormone. We also assessed how levodopa (L-DOPA) and H₂O₂ modulated the effect of estradiol on GDNF expression.

Western-Blot analysis was used to determine GDNF levels in cultured *substantia nigra* cells after incubation with 17 β -estradiol. Using *in vivo* studies we evaluated how 17 β -estradiol affects the action of the dopaminergic toxin - 6-hydroxydopamine (6-OHDA) on the dopaminergic cell viability and the expression of GDNF. Taken together the results showed that, in cultured postnatal substantia nigra cells, 17 β -estradiol promoted the increase of GDNF expression by astrocytes through activation of putative membrane receptors. Exposure to the oxidative agents L-DOPA and H₂O₂ augmented the effect of estradiol. *In vivo*, estradiol protected nigral dopaminergic cells from 6-OHDA induced injury, possibly through stimulation of GDNF synthesis.

ÍNDICE GERAL

RESUMO

ABSTRACT

ÍNDICE GERAL i

ÍNDICE DE FIGURAS iv

LISTA DAS ABREVIATURAS vi

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. O ESTRADIOL E A NEUROPROTECÇÃO 2

1.1.1. MECANISMOS QUE MEDEIAM A NEUROPROTECÇÃO EXERCIDA PELO ESTRADIOL 2

1.1.2. O ESTRADIOL E A NEUROPROTECÇÃO NO MESENCÉFALO 3

1.1.3. O ESTRADIOL E O CONTROLO DOS NÍVEIS DE STRESS OXIDATIVO 4

1.1.4. O ESTRADIOL E AS CÉLULAS DA GLIA 6

1.1.5. O ESTRADIOL E A REGULAÇÃO DA APOPTOSE 7

1.1.6. O ESTRADIOL E OS FACTORES NEUOTRÓFICOS 9

1.1.6.1. O BDNF 10

1.1.6.2. O GDNF 12

1.1.6.2.1 O GDNF E O ESTRADIOL 16

1.1.6.2.2. O GDNF, O H₂O₂ E A L-DOPA 17

1.2. A DOENÇA DE PARKINSON (DP) 18

1.2.1. O SISTEMA NIGROESTRIATAL 19

1.2.2. CAUSAS DA DP 22

1.2.3. A DP E O STRESS OXIDATIVO 24

1.2.4. OS TRATAMENTOS PARA DP 25

1.2.5. MODELOS EXPERIMENTAIS DE DP 26

1.2.5.1. 6-OHDA 26

1.2.5.2. PARAQUATO 27

1.2.5.3. ROTENONA 27

1.2.5.4. MPTP 27

1.3. O ESTRADIOL E A DP 28

1.4. MODELO EXPERIMENTAL 29

| | |
|---|-----------|
| 1.4.1. ESTUDOS IN VITRO | 29 |
| 1.4.2. ESTUDOS IN VIVO | 30 |
| 1.4.3. MARCADORES CELULARES | 30 |
| 1.4.4. OBJECTIVOS E DESENHO EXPERIMENTAL | 31 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 32 |
| 2.1. ENSAIOS <i>IN VITRO</i> | 32 |
| 2.1.1. PREPARAÇÃO DE CULTURAS MISTAS DE ASTRÓCITOS E DE NEURÓNIOS DA <i>SUBSTANTIA NIGRA</i> | 32 |
| 2.1.1.1. CULTURA DE ASTRÓCITOS | 32 |
| 2.1.1.2. CULTURA DE NEURÓNIOS | 34 |
| 2.1.2. TRATAMENTO DAS CULTURAS | 34 |
| 2.1.3. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA TOTAL | 36 |
| 2.1.4. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GDNF NOS EXTRACTOS CELULARES POR WESTERN-BLOT | 37 |
| 2.1.5. LOCALIZAÇÃO CELULAR DA EXPRESSÃO DE GDNF POR CITOMETRIA DE FLUXO | 38 |
| 2.2. ESTUDO <i>IN VIVO</i> | 39 |
| 2.2.1. IMPLANTAÇÃO DAS CÁPSULAS DE LIBERTAÇÃO LENTA | 39 |
| 2.2.2. INJEÇÃO ESTRIATAL DE 6-OHDA | 40 |
| 2.2.3. IMUNOHISTOQUÍMICA | 41 |
| 2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA | 44 |
| 3. RESULTADOS | 45 |
| 3.1. EFEITO DO 17 β -ESTRADIOL NA EXPRESSÃO DE GDNF EM CÉLULAS DE <i>SUBSTANTIA NIGRA</i> EM CULTURA | 45 |
| 3.2. LOCALIZAÇÃO CELULAR DA EXPRESSÃO DE GDNF EM CÉLULAS DE <i>SUBSTANTIA NIGRA</i> EM CULTURA | 46 |
| 3.3. CONTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES DE ESTROGÉNIO PARA A EXPRESSÃO DE GDNF EM CÉLULAS DA <i>SUBSTANTIA NIGRA</i> EM CULTURA | 48 |
| 3.4. AUMENTO DA EXPRESSÃO DE GDNF EM CULTURAS DE <i>SUBSTANTIA NIGRA</i> POR ACÇÃO DO 17 β -ESTRADIOL: MODULAÇÃO POR EXPOSIÇÃO AOS AGENTES OXIDANTES L-DOPA E H ₂ O ₂ | 50 |

| | |
|---|----|
| 3.5. ESTUDOS <i>IN VIVO</i> DA ACÇÃO DO 17 β -ESTRADIOL NA VIA NIGROESTRIATAL | 53 |
| 4. DISCUSSÃO | 59 |
| 5. CONCLUSÕES | 66 |
| 6. PERSPECTIVAS FUTURAS | 67 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| 1: Estrutura química do 17 β -estradiol | 1 |
| 2: Representação do efeito anti-apoptótico do estradiol na toxicidade exercida por BSO e BLM | 8 |
| 3: Ilustração esquemática da cooperação entre diversas vias de sinalização no desenvolvimento durante diferentes fases de formação de neurónios dopaminérgicos mesencefálicos de rato | 10 |
| 4: Estrutura do factor neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF) | 13 |
| 5: Vias de sinalização intracelular mediadas pela activação do RET após ligação ao complexo GDNF-GFR α 1 | 14 |
| 6: Esquematização da interacção do estrogénio e GDNF com os neurónios dopaminérgicos durante fases de desenvolvimento | 17 |
| 7: Representação do metabolismo e transporte da dopamina | 19 |
| 8: Secção parasagital de embrião de rato onde está evidenciada a escuro a via dopaminérgica nigroestriatal | 20 |
| 9: Representação dos gânglios da base | 21 |
| 10: Representação do que ocorre ao nível dos gânglios da base na DP devido à depleção de dopamina no estriado. | 22 |
| 11: Secção coronal de rato que define a azul a zona pretendida para dissecação – a <i>substantia nigra</i> (SN) | 32 |
| 12: Representação da câmara de Neubauer | 33 |
| 13: Tratamento das culturas mistas de SN em função dos tempos de incubação de cada condição | 35 |
| 14: Tratamento dos animais em função dos tempos de cada condição | 40 |
| 15: Mesa esterotáxica para neurocirurgia em ratos | 40 |
| 16: Relação entre as suturas cranianas e o bregma no rato | 41 |
| 17: Efeito de diferentes concentrações de 17 β -estradiol na expressão de GDNF em culturas de SN | 45 |
| 18: <i>Dot-plot forward scatter/ side scatter</i> da população de células de SN em cultura | 46 |

| | |
|---|----|
| 19: <i>Dot-plot</i> de fluorescência GFAP / fluorescência GDNF da população de células de SN em cultura | 47 |
| 20: Efeito do 17β-estradiol conjugado a BSA na expressão de GDNF em culturas de SN | 48 |
| 21: Efeito do ICI na expressão de GDNF em culturas de SN | 49 |
| 22: Acção da L-DOPA no efeito do 17β-estradiol na expressão de GDNF em culturas de SN | 51 |
| 23: Acção do H ₂ O ₂ na estimulação da expressão de GDNF induzida por 17β-estradiol em culturas de SN | 52 |
| 24: Comparação entre as acções da L-DOPA e do H ₂ O ₂ no do efeito de diferentes concentrações de 17β-estradiol na expressão de GDNF em culturas de SN | 53 |
| 25: Imunohistoquímica para TH de cortes coronais da SN submetidos a tratamento com 17β-estradiol e a posterior lesão unilateral com 6-OHDA | 54 |
| 26: Contagem do número de células positivas para TH na SN referente à imunohistoquímica de cortes coronais submetidos a tratamento com 17β-estradiol e a posterior lesão unilateral com 6-OHDA | 55 |
| 27: Imunohistoquímica para TH de cortes coronais do estriado de animais submetidos a tratamento com 17β-estradiol e a posterior lesão unilateral com 6-OHDA | 56 |
| 28: Imunohistoquímica para GDNF de cortes coronais da SN de animais submetidos a tratamento com 17β-estradiol | 58 |
| 29: Mecanismo da regulação dos níveis de GDNF na SN pelo estradiol e sua contribuição na neuroprotecção | 64 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| ABREVIATURA | NOME COMPLETO |
|--------------|--|
| 6-OHDA | 6-hidroxidopamina |
| AMPC | Adenosina monofosfato cíclico |
| AP1 | Proteína ativadora 1 |
| BDNF | Factor neurotrófico derivado de cérebro |
| BLM | Bleomicina sulfato |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| BSO | L-butionina-(S,R)-sulfoximina |
| COMT | Catecol-O-metiltransferase |
| CREB | Elementos de ligação responsivos a AMPc |
| DAT | Transportador de dopamina |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| DOPAC | Ácido-3,4-dihidroxifenilacético |
| DP | Doença de Parkinson |
| FDU | 5-fluorodesoxiuridina |
| GDNF | Factor neurotrófico derivado de uma linha de células da glia |
| GFAP | Proteína ácida fibrilar glial |
| GFR α | Receptor α da família do GDNF |
| GSH Px | Glutathione peroxidase |
| IP3K | Cinase do inositol trifosfato |
| JNK | Cinase c-Jun N-terminal |
| L-DOPA | L-dihidroxifenilalanina |
| MAO | Monoaminoxidase |
| MAP2 | Proteína 2 associada a microtúbulos |
| MAPK | Proteína cinase activada por mitogénios |
| MEM | Meio mínimo essencial |
| MPP+ | lão 1-metil-4-fenilpiridina |
| MPTP | 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina |
| PBS | Tampão fosfato salino |

| | |
|------------------|---|
| PKA | Proteína cinase A |
| RNA _m | Ácido ribonucleico mensageiro |
| ROS | Espécies reactivas de oxigénio |
| rpm | Rotações por minuto |
| SN | <i>Substantia Nigra</i> |
| TBST | Tampão salino de TRIS com Tween |
| TGF- β | Factor β de crescimento e transformação |
| TH | Tirosina hidroxilase |
| TEMED | Tetrametiletilenodiamina |
| VMAT | Transportador vesicular de dopamina |
| VTA | Área tegmental ventral |

1. INTRODUÇÃO

O 17 β -estradiol é uma hormona sexual que juntamente com a estrona formam o grupo dos estrogénios. Para além de regular funções de reprodução o estradiol tem também efeitos importantes nos ossos, no fígado, nos vasos sanguíneos e no cérebro. Tal como outras hormonas esteróides, o estradiol deriva do colesterol e é sintetizado a partir da testosterona nas células granulosas dos ovários, nas artérias e no cérebro (Stryer, 1987) e interage com as células alvo através do mecanismo clássico ou genómico, que envolve receptores intracelulares (Evans et al., 1998), ou através de mecanismos não genómicos que dependem de receptores membranares. No mecanismo de acção genómico, o estradiol entra nas células e interage com o receptor intracelular formando um complexo que interage com o DNA regulando a transcrição génica (Evans et al., 1998).

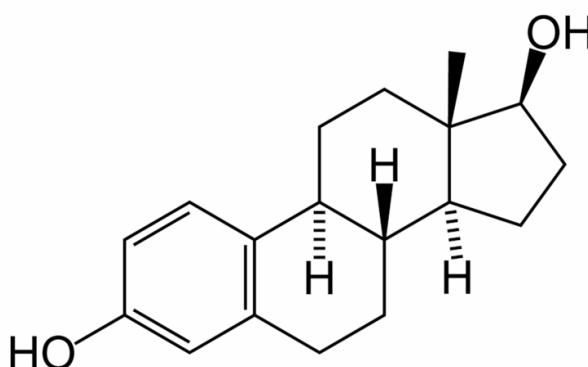


Figura 1: Estrutura química do 17 β -estradiol

Os receptores de estrogénios (RE) envolvidos nos mecanismos de acção do estradiol podem ser do tipo α ou β , enquanto que os outros estrogénios apenas se ligam a um dos tipos de RE (Harding et al., 2004).

1.1. O ESTRADIOL E A NEUROPROTECÇÃO

A acção protectora dos estrogénios foi demonstrada em situações de traumatismo e isquémia, em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson (DP) e a doença de Alzheimer (DA) e na sobrevivência, maturação e funcionamento das células dopaminérgicas mesencefálicas dos mamíferos (Cyr et al., 2002). Também em vários estudos *in vivo* e *in vitro* foi comprovada a acção dos estrogénios contra vários agentes neurotóxicos (revisto por Kipp et al., 2006).

Os efeitos dos estrogénios no cérebro foram referidos em inúmeros estudos epidemiológicos e clínicos. No entanto, alguns estudos indicam que estes efeitos só se observam para altas concentrações da hormona (na gama dos μM) (Cyr et al., 2002) ou em determinadas fases de desenvolvimento cerebral. Os estrogénios podem ser neurotóxicos durante o desenvolvimento cerebral e neuroprotectores durante o envelhecimento (Cyr et al., 2002).

A neuroprotecção exercida pelo estradiol parece estar relacionada com a inibição do stress oxidativo (Sawada et al., 1998), a regulação das células da glia (Liu et al., 2005), a inibição da apoptose (Sawada et al., 2000) e a promoção da produção de factores neurotróficos (revisto por Kipp et al., 2006).

1.1.1. MECANISMOS QUE MEDEIAM A NEUROPROTECÇÃO EXERCIDA PELO ESTRADIOL

Os efeitos neuroprotectores do estradiol podem resultar da transcrição de genes importantes para a sobrevivência celular. Vários estudos demonstram que os estrogénios participam na regulação do gene antiapoptótico Bcl-2, de factores neurotróficos como o factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o factor de crescimento neuronal (NGF) e o factor neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF) (Singer et al., 1998; Dubal et al., 1999).

Foi também descrita a acção do estradiol como antagonista de receptores de ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), como antioxidante, e ao nível da via de sinalização das proteínas cinases activadas por mitogénios (MAPK) e da cascata da cinase do inositol trifosfato (IP3K) (Wallace et al., 2006).

Tanto os neurónios não dopaminérgicos como os neurónios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) e da *substantia nigra* (SN) têm receptores de estrogénio (RE) intracelulares (revisto por Kipp et al., 2006). Mas, para além destes RE, os neurónios também têm receptores de estradiol e de outros esteróides na membrana plasmática que medeiam acções não genómicas que envolvem cascatas intracelulares (Cyr et al., 2002; Inanova et al., 2002). Toran-Allerand et al. (2002) demonstraram a existência de um RE diferente das formas α e β . Este receptor, situado na membrana plasmática de células SN4741 (linha celular de neurónios dopaminérgicos da SN), é activado pelos dois isómeros de estradiol em concentrações na ordem dos pM (Biewenga et al., 2005). No entanto, apesar dos RE membranares serem geralmente considerados como activadores de vias não genómicas, também é possível que a ligação dos estrogénios a estes receptores inicie uma cascata intracelular que envolva a interacção com o DNA (Blurton-Jones et al., 2004).

A capacidade do 17- β estradiol modular a sobrevivência neuronal depende do RE presente nessas células. A activação do RE α induz neuroprotecção, enquanto que a activação do RE β induz apoptose. No entanto, nos neurónios que expressam ambos os tipos de RE, o estradiol tem acção neuroprotectora (revisto por Cyr et al., 2002). A análise dos RE α e β presentes na SN indica que apesar de existirem os dois receptores, o RE β é mais abundante e o RE α não existe na zona reticulada da SN (Mitra et al., 2003). A indução de apoptose pelo estradiol através do RE β requer a expressão do ligando da proteína *Fas* o que faz com que as células onde estas proteínas não são expressas não sofram de processos apoptóticos mediados pelo estradiol (revisto por Cyr et al., 2002).

1.1.2. O ESTRADIOL E A NEUROPROTECÇÃO NO MESENCÉFALO

O estrogénio tem uma acção neuroprotectora mais acentuada no mesencéfalo, no córtex cerebral e no hipocampo, embora também exerça essa acção noutras zonas do cérebro (Cyr et al., 2002). Numerosas são as evidências da acção reguladora do 17 β -estradiol em neurónios dopaminérgicos no mesencéfalo, tanto em fases pré-natais como em fases pós-natais e mesmo durante a idade adulta (revisto por Kipp et al., 2006).

No embrião, o estrogénio pode ser produzido tanto no mesencéfalo como no estriado. O estrogénio sintetizado a nível cerebral actua nessas zonas de forma mais eficaz que o estrogénio sistémico. No entanto, a formação de estrogénio no cérebro decai com a idade e quando o cérebro

diminui a produção de estrogénio, o estrogénio sistémico tem maior importância a nível cerebral (revisto por Kipp et al., 2006).

Resultados obtidos com neurónios dopaminérgicos em cultura mostraram que o estradiol promove o aumento do número e do tamanho das neurites, alterações essas que parecem estar associadas à formação de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), activação da proteína cinase A (PKA) e fosforilação de elementos de ligação responsivos a AMPc (CREB) (Beyer et al., 2000).

A síntese e a libertação de dopamina, a expressão dos receptores de dopamina, transportadores de dopamina (DAT) e a expressão da catecol-O-metiltransferase (COMT – uma enzima de metabolização da dopamina presente na fenda sináptica) são também regulados por esteróides ovários (revisto por Cyr et al., 2002).

Ensaio efectuado em culturas de neurónios dopaminérgicos neo-natais demonstraram que por activação dos receptores nucleares o estrogénio induz a síntese de dopamina ao aumentar a expressão de tirosina hidroxilase (TH) (Ivanova et al., 2003). Outros estudos, realizados em células do mesencéfalo, indicam que o estrogénio diminui os níveis de transportadores de dopamina (DATs) (revisto por Kipp et al., 2006). A indução da produção de dopamina e a inibição do seu metabolismo parecem contribuir para a formação e a estabilidade das sinapses e a iniciação da transmissão dopaminérgica funcional (revisto por Kipp et al., 2006).

Estudos com ratos machos demonstraram que o 17 β -estradiol reduz a perda de dopamina estriatal promovida pela 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) – uma neurotoxina utilizada em modelos de DP –, enquanto que o 17 α -estradiol (um isómero inactivo de estradiol) não tem esse efeito. Estas observações apoiam a participação dos RE intracelulares neste efeito do estradiol, uma vez que só o 17 β -estradiol tem actividade específica intracelular (Biewenga et al., 2005). Noutros estudos com ratos ovariectomizados o 17- β estradiol, mas não o 17- α estradiol, induziu o aumento da actividade da TH estriatal e a redução da actividade da COMT (revisto por Cyr et al., 2002).

1.1.3. O ESTRADIOL E O CONTROLO DOS NÍVEIS DE STRESS OXIDATIVO

O stress oxidativo pode ser causado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e a capacidade dos sistemas biológicos impedirem a acção dessas moléculas ou repararem os danos por elas causados. As ROS podem ser radicais livres ou

peróxidos e causam alterações celulares ao nível proteico, lipídico e do DNA. De entre as ROS que mais afectam os neurónios, destacam-se o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo (OH) e o ião superóxido (O_2^-).

O stress oxidativo contribui para a morte de células dopaminérgicas em doenças neurodegenerativas, mas os estudos clínicos baseados em estratégias antioxidantes são geralmente inconclusivos. Numerosos estudos com diversos modelos experimentais, incluindo culturas neuronais primárias, linhas celulares, explantes e estudos *in vivo*, indicam uma variedade de mecanismos para explicar a neuroprotecção exercida pelo 17β -estradiol contra o stress oxidativo (Biewenga et al., 2005). Estudos *in vitro* com concentrações de estrogénio na ordem dos μM , muito superiores às encontradas no cérebro, resultam em efeitos não específicos do estradiol. A protecção antioxidante exercida por concentrações de estradiol na ordem dos μM tem sido atribuída à rápida acção do grupo hidroxilo do C3 do seu anel fenólico A na retenção de radicais livres (Wallace et al., 2006; Sawada et al., 1998).

Estudos efectuados por Sawada et al. (1998), em neurónios dopaminérgicos, demonstraram que o estradiol suprimiu a peroxidação membranar induzida por ROS. Em ensaios que usaram glutamato, aniões superóxido e peróxido de hidrogénio como geradores de stress oxidativo observou-se morte neuronal significativa, que foi reduzida pela presença do 17β -estradiol. A exposição ao glutamato resultou em morte tanto de neurónios dopaminérgicos como de neurónios não dopaminérgicos e foi também prevenida pela pré-incubação com 17β -estradiol. A neurotoxicidade exercida pelo glutamato deve-se ao facto da activação dos receptores NMDA pelo glutamato aumentar o influxo de cálcio e consequente comprometimento celular. A protecção exercida pelo estradiol nesta forma de toxicidade não foi atribuída à estrutura geral dos esteróides (Sawada et al., 1998) mas sim apontada como sendo mediada por receptores NMDA (Sawada et al., 1996a) em que o estradiol parece actuar como antagonista bloqueando a ligação do glutamato e impedindo o aumento do influxo do cálcio (Sawada et al., 1998). Este mecanismo tóxico assiste-se ao nível dos neurónios mesencefálicos (Sawada et al., 1996a) e o estradiol parece actuar também como bloqueador dos canais de cálcio, sendo este outro mecanismo de neuroprotecção (Mermelstein et al., 1996). Desta forma, verifica-se que o modo pelo qual a hormona protege as células da toxicidade glutamatérgica não é mediada por receptores de estrogénios nem por transcrição genómica mas é resultado da redução da produção de ROS (Sawada et al., 1998).

Na toxicidade exercida pelo glutamato, tanto o 17α -estradiol como o 17β -estradiol, promovem a neuroprotecção. Contudo, apenas em neurónios dopaminérgicos se assiste ao efeito

de ambas as moléculas. Neste caso a neuroprotecção do 17 α -estradiol contra o glutamato é atribuída a propriedades antioxidantes da hormona mediadas por receptores membranares. A ligação ou não do 17 α -estradiol aos neurónios sugere a existência de diferenças estruturais entre os RE membranares dos neurónios dopaminérgicos e dos neurónios não dopaminérgicos. Evidências experimentais sugerem que os receptores presentes nos neurónios dopaminérgicos possuem afinidade para ambos os esteroisómeros de estradiol, enquanto que o 17 α -estradiol não se liga aos receptores presentes em neurónios não dopaminérgicos, conferindo neuroprotecção selectivamente nos neurónios dopaminérgicos (Sawada et al., 1998).

Estudos efectuados numa linha celular de neurónios dopaminérgicos da SN demonstraram que tanto o β - como o α -estradiol conferem protecção contra o stress oxidativo induzido por H₂O₂ e que este mecanismo não é mediado pela via clássica dos receptores de estrogénios (Biewenga et al., 2005).

Conhece-se o efeito neurotóxico de duas proteínas existentes no vírus da imunodeficiência humana (HIV), a gp120 e a tat, que promovem a perda da função dos transportadores de dopamina (DAT) com consequente diminuição da entrada de dopamina para as células que resulta em demência e sintomas da DP (Wallace et al., 2006). Segundo Clark e Bessinger (1997), as mulheres pós-menopáusicas infectadas com HIV têm o risco de sofrer destes sintomas devido aos baixos níveis de estrogénios dessa condição fisiológica. Esta ideia foi apoiada por estudos com 17 β -estradiol, que indicaram que este previne a morte neuronal induzida por uma protease produzida pelo HIV-1 (Hawkins et al., 1999). A exposição a 17 β -estradiol é suficiente para reduzir o stress oxidativo causado pelas gp 120 e tat em células SKNSH (linha celular de neuroblastoma humano). Este efeito é rápido, o que sugere não ser mediado por receptores nucleares (Wallace et al., 2006).

1.1.4. O ESTRADIOL E AS CÉLULAS DA GLIA

A neuroprotecção exercida pelo estrogénio depende de interacções com neurónios mas também com outras células como os astrócitos e a microglia (revisto por Kipp et al., 2006). Os estrogénios têm a capacidade de regular a expressão e a função dos transportadores de glutamato nos astrócitos mesencefálicos. Deste modo podem controlar os níveis de glutamato extracelular e consequentemente a excitotoxicidade (Voutsinos-Porche et al., 2003).

A activação glial observada no modelo do MPTP participa na cascata de eventos que provocam a morte dos neurónios da SN. Estudos *in vitro* demonstram que os estrogénios são capazes de modificar a expressão de mediadores da inflamação, tais como as citocinas e as quimocinas pela microglia e astrócitos (revisto por Morale et al., 2006). As citocinas têm um importante papel na patologia da neurodegeneração e da neuroinflamação no sistema nervoso central. No cérebro as citocinas são produzidas pelos astrócitos e microglia, no entanto citocinas da circulação periférica podem atingir o cérebro devido a fenómenos de infiltração imunoinflamatória de células T e macrófagos (revisto por Kipp et al., 2006).

A reacção glial observada em modelos de DP contribui para a degeneração dos neurónios dopaminérgicos. Os RE estão presentes nas células da glia e são alvos da acção dos estrogénios. Por activação de ambos os RE α e β os estrogénios inibem a activação da microglia e consequentemente exercem uma acção neuroprotectora. O efeito através do RE β , localizado no citoplasma na microglia, sugere um possível envolvimento de efeitos não clássicos dos estrogénios na microglia (Liu et al., 2005).

Estudos *in vivo* demonstraram que os estrogénios atenuam a perda de neurónios dopaminérgicos da SN e de fibras dopaminérgicas estriatais induzida por MPTP e atenuam também a activação glial induzida por esta toxina, sugerindo que o efeito neuroprotector dos estrogénios é mediado por inibição da activação da glia, apesar do efeito directo nos neurónios não estar excluído (Tripanichkul et al., 2006). Desta forma, é previsível que outros tipos de células, diferentes dos neurónios, sejam intermediárias na neuroprotecção (Dhandapani et al., 2002). Os estrogénios são ainda capazes de impedir a resposta inflamatória e a activação da microglia induzida por lipopolissacáridos (Vegeto et al., 2001).

1.1.5. O ESTRADIOL E A REGULAÇÃO DA APOPTOSE

A exposição de culturas de neurónios mesencefálicos a L-butionina-(S,R)-sulfoximina (BSO) ou a bleomicina sulfato (BLM) promove a clivagem do DNA, indicadora de apoptose (Gavrieli et al., 1992; Saraste et al., 1999). A indução da apoptose pelo BSO é provocada pelo aumento de H₂O₂ intracelular em resultado da diminuição da glutatona peroxidase. Um estudo efectuado por (Sawada et al (2000) em neurónios dopaminérgicos da SN demonstrou que o 17 β -estradiol confere

neuroprotecção contra a apoptose induzida por BSO e BLM, e que essa protecção não se deve à estrutura geral dos esteróides.

A regulação da Bcl-2 tem um papel fundamental no processo anti-apoptótico. Um estudo efectuado com neurónios mesencefálicos demonstrou que o GDNF participa na regulação da Bcl-2, promovendo a neuroprotecção contra a apoptose por BSO e BLM. A interacção do estradiol com o receptor desencadeia os seus efeitos através de elementos responsivos a estrogénios (ERE), que se ligam ao DNA e alteram a transcrição genética da AP-1. Desta forma o 17- β estradiol pode exercer o seu efeito anti-apoptótico através da activação de genes anti-apoptóticos ou através da inibição de genes pró-apoptóticos. A inibição da transcrição da AP-1 devida à activação da cinase terminal Jun (JNK) e da caspase 3 também é exercida pelo 17 α -estradiol, um estereoisómero sem actividade hormonal. O 17 α -estradiol pode activar o RE- β e causar a mesma resposta primária que o 17 β -estradiol quando aplicado na dose apropriada mas continua a não exercer efeitos neuroprotectores. Tal pode dever-se não à baixa afinidade para RE- β mas sim à resposta secundária da molécula (Sawada et al., 2000). A figura 2 esquematiza o efeito anti-apoptótico do estradiol na toxicidade induzida por BSO e BLM.

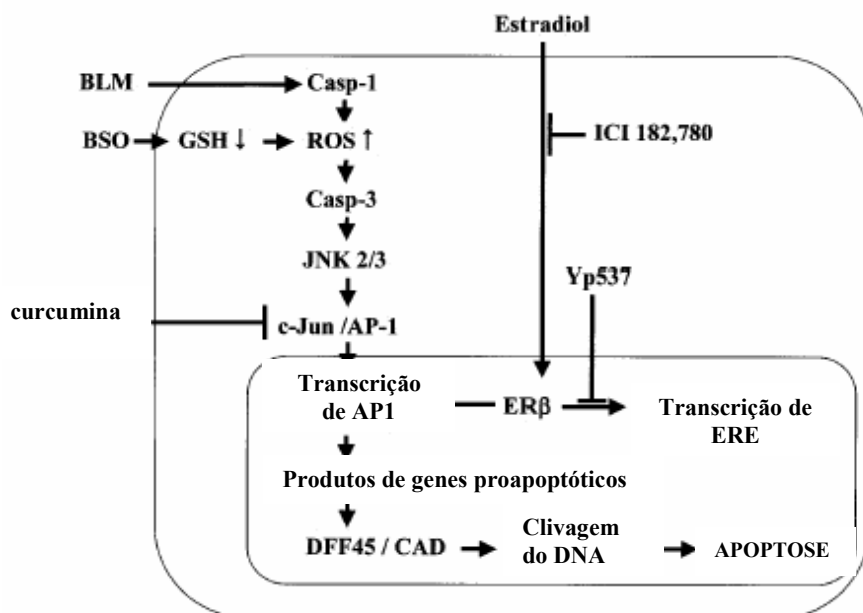


Figura 2: Representação do efeito anti-apoptótico do estradiol na toxicidade exercida por BSO e BLM (adaptado de Sawada et al., 2000).

O estrogénio protege os neurónios da morte neuronal induzida por stress oxidativo e consequente apoptose activada pela caspase 3. Esse efeito neuroprotector é mediado por regulação de genes mitocondriais. Estudos efectuados em células de mesencéfalo de ratos embrionários demonstraram que essa neuroprotecção envolve diversas vias de transdução de sinal que têm como alvo a mitocôndria (Beyer et al., 2003).

1.1.6. O ESTRADIOL E OS FACTORES NEUOTRÓFICOS

A descoberta do factor de crescimento neuronal (NGF) representou a ponto de partida para a descoberta dos muitos factores neurotróficos que actualmente se conhecem (tabela 1). Os factores neurotróficos são proteínas com capacidade de regular a sobrevivência e a diferenciação dos neurónios, o desenvolvimento do sistema nervoso, a plasticidade do sistema nervoso adulto e a manutenção da sua integridade estrutural. As neurotrofinas incluem o factor de crescimento neuronal (NFG), o factor neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), a neurotrofina 3 (NT3), a NT4/5 e a NT6, que foram os primeiros factores neurotróficos a serem estudados. Nesses estudos verificou-se que estas proteínas estimulavam receptores com actividade cinase relacionada com a tropomiosina (TRK) e se ligavam a proteínas de ligação de baixa afinidade como a p57 (revisto por Hefti, 1997).

| Superfamília do NGF | Família do GDNF | Superfamília da neurocina | Superfamília dos factores de crescimento não neuronais |
|--|---|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> Factor de crescimento neuronal Factor neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) Neurotrofina 3 (NT3) Neurotrofina 4/5 (NT4/5) Neurotrofina 6 (NT6) | <ul style="list-style-type: none"> Factor neurotrófico derivado de linha de células gliais (GDNF) Neurturina (NTN) Persefina (PSP) Artemina (art) | <ul style="list-style-type: none"> Factor neurotrófico ciliar (CNTF) Factor inibidor da leucemia (LIF) Interleucina 6 (IL6) Cardiotrofina 1 (CT1) Oncostatina M | <ul style="list-style-type: none"> Factor de crescimento dos fibroblastos 1 (FGF1) Factor de crescimento dos fibroblastos 2 (FGF2) Factor de crescimento da epiderme (EGF) Factor de crescimento da família da insulina (IGF) Proteína morfogénica óssea (BMP) |

Tabela 1: Esquema representativo dos factores neurotróficos e suas famílias (adaptado de Siegel e Chauhan 2000).

A acção dos factores neurotróficos na sobrevivência neuronal ocorre quer durante o desenvolvimento quer após lesões cerebrais (Thoenen, H., 1995; Lindvall et al., 1994; Tucker et al., 2001; Enokido et al., 1999; Vicario-Abejon et al., 1998). Inúmeras evidências sugerem que alterações na expressão de factores neurotróficos podem contribuir para a neurodegeneração. De facto, neurónios que não recebem factores neurotróficos em quantidades suficientes entram num processo apoptótico (Thoenen et al., 1987).

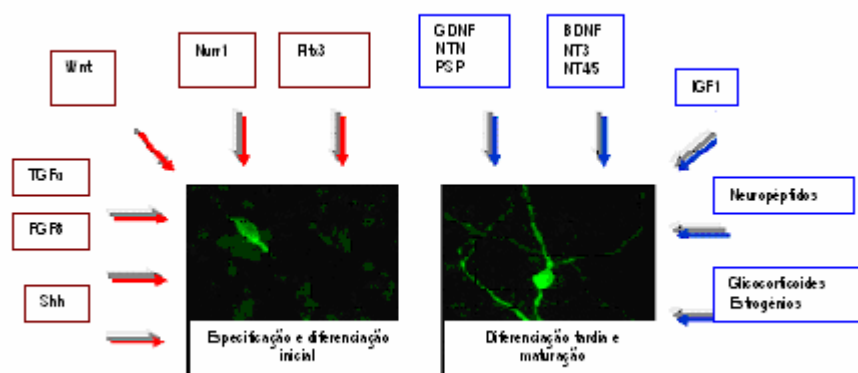


Figura 3: Ilustração esquemática da cooperação entre diversas vias de sinalização no desenvolvimento durante diferentes fases de formação de neurónios dopaminérgicos mesencefálicos de rato (adaptado de revisão por Kipp et al., 2006).

Estes péptidos difusíveis são produzidos por neurónios e células da glia e transportados maioritariamente de forma retrógrada, (apesar de haver situações em que são transportados anterogradamente) sinalizando outras células paracrinamente ou a própria célula de modo autócrino (Kandel et al., 2003).

Os factores neurotróficos e o estrogénio são essenciais na regulação do desenvolvimento e função dos neurónios dopaminérgicos mesencefálicos. As interações entre o estrogénio e os factores de crescimento regulam a síntese de proteínas necessárias à diferenciação, sobrevivência e manutenção das funções destas células.

Duas classes de factores neurotróficos (neurotrofinas e proteínas da família TGF- β) exercem um papel importante no desenvolvimento dos neurónios dopaminérgicos e na manutenção das suas propriedades funcionais (revisão por Kipp et al., 2006). Por outro lado, os estrogénios influenciam a expressão dos receptores de factores neurotróficos, nomeadamente o receptor trkA do NGF e o trkB do BDNF (Sohrabji et al., 1994; Jezierski et al., 2000).

1.1.6.1. O BDNF

É sabido que o estradiol induz a produção de BDNF no cérebro, nomeadamente no bulbo olfactivo e no córtex cerebral. No que diz respeito ao mesencéfalo as primeiras evidências das interacções entre o estradiol e as neurotrofinas surgiram quando se verificou que o BDNF, a enzima aromatase (que converte a testosterona em 17β -estradiol) e os RE nucleares eram expressos nas mesmas células. No mesencéfalo o 17β -estradiol induz o aumento da expressão de BDNF por mecanismos não genómicos. Este aumento de BDNF parece proteger os neurónios dopaminérgicos da SN da morte celular (revisto por Kipp et al., 2006).

Vários estudos demonstraram que a estabilidade de culturas neuronais derivadas de estádios iniciais da neurogénese é mantida pelo BDNF, enquanto que neurónios mais velhos requerem NGF para sobreviverem. O BDNF foi também indicado como indutor da formação de sinapses excitatórias e inibitórias em células de hipocampo embrionário, provando assim ser essencial durante o desenvolvimento (Thoenen, H., 1995; Lindvall et al., 1994; Tucker et al., 2001; Enokido et al., 1999; Vicario-Abejon et al., 1998). A reposição de estrogénios após gonadectomia aumenta a expressão do BDNF no hipocampo de ratos recém-nascidos, o que indica que durante o desenvolvimento os estrogénios podem influenciar a diferenciação neuronal através da regulação do BDNF (Solum et al., 2002).

A interacção directa entre os RE, principalmente o RE α e o BDNF ocorre nas células piramidais. No entanto, nos neurónios GABAérgicos corticais essa acção não é directa tendo como intermediário a fosforilação de CREB (Blurton-Jones et al., 2004; Panickar et al., 1997). Os RE de neurónios GABAérgicos corticais reduzem a actividade GABAérgica local e ao mesmo tempo estimulam a produção de BDNF. Estudos *in vitro* mostraram também uma interacção entre estrogénios, GABA e BDNF em culturas de hipocampo, o que sugere que os RE no hipocampo influenciam directamente as células GABAérgicas e indirectamente a expressão de BDNF através da via não clássica dos receptores (Murphy et al., 1998). A co-localização dos RE com os receptores de alguns factores neurotróficos no prosencéfalo sugere ainda uma ligação entre os estrogénios e os factores neurotróficos. Esta hipótese é também apoiada pelo aumento da expressão de RE após estimulação da transcrição do gene do BDNF, o que evidencia a relação directa entre os estrogénios e o BDNF. Existem no entanto estudos que indicam um baixo nível de co-localização entre os RE e o BDNF em locais como o hipotálamo, o neo-córtex adulto, o hipocampo dorsal e a amígdala. Contrariamente, no hipocampo de mamíferos adultos, os

estrogénios aumentam significativamente os níveis de BDNF (Toran-Allerand, C. D., 1984; Sohrabji et al., 1995; Jezierski et al., 2000; Gibbs, R. B., 1999; Liu et al., 2001b; Pan et al., 1999).

1.1.6.2. O GDNF

O GDNF (figura 4) foi isolado e purificado a partir do meio condicionado de uma cultura de células da glia de rato da linhagem B49 (Lin et al., 1993). Trata-se de uma proteína homodimérica, heterogeneamente glicosilada e com massa molecular entre os 33 e 45 KDa (Lin et al., 1994), que pode ser expressa em astrócitos (Schaar et al., 1993) e em neurónios (Schmidt-Kastner et al., 1994). O GDNF está presente em vários sistemas neuronais, e essa localização depende da actividade local e do estágio de desenvolvimento do indivíduo (Del Fiacco et al., 2002). Há níveis detectáveis de GDNF no tálamo, hipocampo, cerebelo, córtex, medula espinhal e SN entre outros locais do sistema nervoso (Choi-Lundberg et al., 1995; Del Fiacco et al., 2002). No entanto, a expressão do GDNF não está limitada ao sistema nervoso mas ocorre noutros órgãos como os rins, pulmões, gónadas, intestinos, osso, fígado, coração, músculos esqueléticos e glândulas supra-renais (Trupp et al., 1995)

No que se refere à via nigroestriatal, o GDNF é transportado retrogradamente para os neurónios dopaminérgicos da SN a partir do estriado e tal facto é corroborado pela existência de receptores do GDNF na SN. No entanto, a SN também expressa níveis significativos de GDNF. A população neuronal dopaminérgica da SN parece ser regulada por interacções com o estriado, pois a disrupção das interacções nigroestriatais por lesão no estriado induz a morte apoptótica nos neurónios dopaminérgicos (Tomic et al., 1995; Yu et al., 1998).

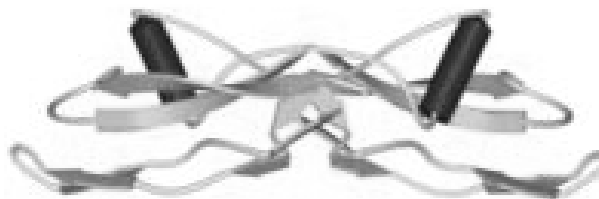


Figura 4: Estrutura do factor neurotrófico derivado de uma linha de células da glia (GDNF) (adaptado de <http://en.wikipedia.org/wiki/GDNF>).

As respostas celulares desencadeadas pelos membros da família do GDNF são mediadas por um receptor com actividade de tirosina cinase, codificado pelo proto-oncogene RET, e pelos receptores α da família do GDNF ($GFR\alpha$). Segundo Airaksinen e Saarma (2002), um dímero de GDNF liga-se ao $GFR\alpha1$ monomérico ou dimérico. Por sua vez, o complexo formado interage com duas moléculas de RET, fosforilando resíduos de tirosina específicos e desencadeando a sinalização intracelular. Entre as vias que podem ser activadas a partir desta fosforilação encontram-se as vias da cinase regulada por sinalização extracelular (ERK), da proteína cinase activada por mitogénios (MAPK), da cinase do inositol trifosfato (IP3K), da proteína cinase B (PCB), da proteína inibidora da apoptose neuronal (NAIP) e da proteína inibidora da apoptose ligada ao cromossoma X (XIAP). A activação destas vias tem como resultado final o aumento da sobrevivência e da proliferação celular (figura 5) (Takahashi et al., 2001).

Em culturas estriatais de células embrionárias, o GDNF activa as vias p42/p44 MAPK mas não o IP3K, promovendo principalmente a diferenciação neuronal de neurónios GABAérgicos sem afectar a sobrevivência e maturação de outros neurónios (Garcia-Martinez et al., 2006).

Apesar das vias de sinalização intracelular acima descritas terem sido as mais estudadas, ensaios *in vitro* sugerem que o GDNF pode desencadear sinalização intracelular independente do receptor RET, através da molécula de adesão das células neuronais (NCAM) (Paratcha et al., 2003). Outros autores também sugerem o $GFR\alpha2$ como receptor do GDNF (Bennett et al., 1998).

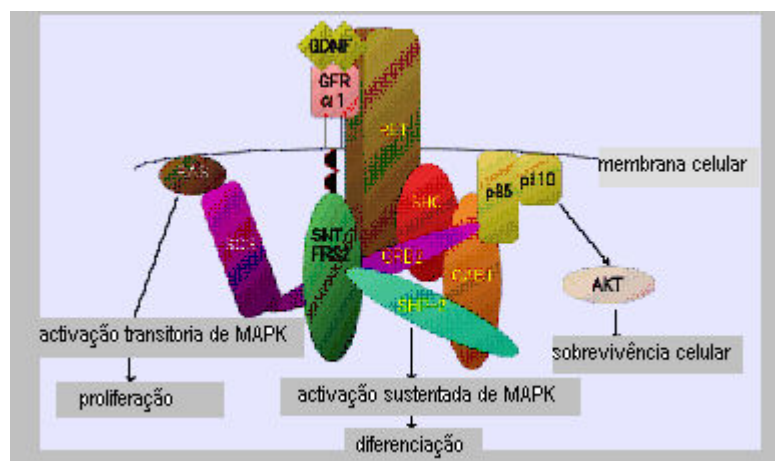


Figura 5: Vias de sinalização intracelular mediadas pela activação do RET após ligação ao complexo GDNF-GFR α 1 (adaptado de Takahashi et al., 2001).

O GDNF caracteriza-se pela capacidade de aumentar o comprimento dos prolongamentos, o tamanho celular e o número dos neurónios dopaminérgicos, exercendo efeitos potentes no desenvolvimento dos neurónios embrionários *in vitro* (Lin et al., 1993). Este factor neurotrófico desempenha ainda um papel crucial na manutenção da função e sobrevivência de neurónios dopaminérgicos *in vivo*, quer no cérebro intacto quer após lesão nigroestriatal (Granhölm et al., 1997).

O GDNF parece ser o factor neurotrófico mais potente na protecção dos neurónios dopaminérgicos contra a degeneração induzida por várias toxinas, assegurando a sobrevivência destes neurónios em modelos animais de DP, como a degeneração induzida por MPTP ou 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos e macacos (Rosenblad et al., 1998). O GDNF modula o processo natural de morte apoptótica em fases precoces do desenvolvimento de neurónios dopaminérgicos da SN (Kholodilov et al., 2004). Porém, um outro estudo efectuado com ratos *knockout* para GDNF e GFR α 1 demonstrou que o GDNF não é um factor trófico essencial em fases iniciais do desenvolvimento dos neurónios dopaminérgicos (Cacalano et al., 1998).

Estudos efectuados em culturas embrionárias de mesencéfalo ventral mostraram que o GDNF favorece a sobrevivência de neurónios dopaminérgicos sem afectar os astrócitos. No entanto o GDNF parece ser produzido pelas duas populações celulares (Saavedra et al., 2006; Wood et al., 2005).

Ensaio efectuados em cultura de SN de ratos recém-nascidos demonstraram a relação existente entre o GDNF e a proteína heme-oxigenase 1 (HO-1). O GDNF inibe a produção da HO-1, mantendo a sua expressão a níveis protectores (Saavedra et al., 2005). Visto tratar-se de uma

proteína que protege as células do stress oxidativo é essencial o controlo da sua expressão. Em excesso, como acontece em doentes com DP, promove a libertação do ferro do grupo heme e aumenta os danos oxidativos nos neurónios dopaminérgicos (Suttner et al., 1999). Os baixos níveis de GDNF em doentes com DP (Chauhan et al., 2001) podem ser uma causa do aumento na expressão de HO-1 e também da consequente neurodegeneração.

O GDNF também exerce uma potente acção protectora em neurónios motores e neurónios centrais noradrenérgicos (Arenas et al., 1995).

A estimulação da produção de dois transportadores de glutamato dependente de GDNF está descrita em estudos com culturas de hipocampo e parece estar implicada na regulação da morte celular pela privação de glicose e oxigénio (revisto por Kipp et al., 2006). Por outro lado, o GDNF está ainda envolvido na regulação da produção e armazenamento de citocinas noutros tecidos (revisto pr Kipp at al., 2006), embora não se possa esquecer que também a resposta inflamatória e o aumento de citocinas estimulam a expressão de GDNF. As citocinas podem ter dois papéis distintos no mesencéfalo. Quando libertadas pelos astrócitos regulam a diferenciação das células progenitoras mesencefálicas em neurónios dopaminérgicos, no entanto também têm o papel pró-inflamatório nomeadamente quando libertadas pela microglia activada (revisto por Kipp et al., 2006; Platanía et al., 2005).

Estudos efectuados em culturas primárias de microglia de rato e em linhas celulares revelaram que o GDNF tem um papel modulador das actividades microgliais para além da sua já conhecida acção nos neurónios. Este factor neurotrófico estimula a produção do NO e de moléculas de adesão e aumenta a capacidade fagocítica da microglia, assim como a actividade da superóxido dismutase (SOD) microglial, activando o sistema antioxidante endógeno da microglia. A actividade microglial parece ser regulada pelo GDNF através da activação da via ERK-MAPK (Chang et al., 2006).

A forte actividade dopaminotrófica do GDNF faz com que se aponte a sua inclusão como terapia alternativa e/ou complementar para L-DOPA em doentes com DP (Del Fiacco et al., 2002). Uma vez que o GDNF não atravessa a barreira hematoencefálica, as estratégias terapêuticas desenvolvidas baseiam-se na libertação local, implantação de células encapsuladas em polímeros, terapia génica mediada por vírus e utilização de células estaminais neuronais. Contudo, os resultados obtidos até ao momento são pouco satisfatórios (Gash et al., 1996; Eslamboli et al., 2005). Outra abordagem possível para elevar os níveis de GDNF consiste em aumentar os seus

níveis endógenos. Para que possam ser desenvolvidas estratégias nesse sentido, torna-se essencial conhecer a forma como a síntese e secreção deste factor neurotrófico são reguladas.

Uma das moléculas que se pensa estar envolvida no mecanismo de regulação deste factor neurotrófico é o estradiol, cuja interacção com o GDNF será estudada neste trabalho.

1.1.6.2.1 O GDNF E O ESTRADIOL

A regulação do GDNF pelo estradiol é ainda pouco clara. Estudos efectuados com células C6 de glioma de rato mostraram que o tamoxifeno (um modulador selectivo de receptores de estrogénio (SERM)) não afecta a expressão de GDNF (Kim et al., 2005). Por outro lado, o pré-tratamento com 17β -estradiol reverte a toxicidade induzida por ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) em cultura de neurónios motores, sendo este efeito protector do estrogénio mediado pela regulação de libertação do GDNF por astrócitos da medula espinhal. Mais ainda, em neurónios motores, a adição de anticorpos anti-GDNF inibe completamente o efeito protector do estrogénio, uma resposta que parece envolver RE nucleares (revisto por Kipp et al., 2006).

A estimulação da expressão de GDNF dependente de estrogénio também tem sido estudada no mesencéfalo, onde se observa a existência de efeito protector contra a DP. Este efeito parece estar relacionado com a via não clássica da acção estrogénica e não ter relação com a regulação directa da transcrição (revisto por Kipp et al., 2006).

No hipotálamo neonatal de rato, observou-se a estimulação da síntese de GDNF por acção do estrogénio. Este efeito de aumento da produção de GDNF é restrito aos neurónios, mediado por canais de cálcio e pela proteína cinase A, não envolvendo os RE nucleares (Ivanova et al., 2002).

Estudos em culturas embrionárias de neurónios e de astrócitos de mesencéfalo neo-natal indicaram que o estrogénio induz a transcrição de GDNF unicamente em astrócitos e não em neurónios. Este efeito não é mediado por RE nucleares, mas sim por canais de cálcio e pela activação da MAPK. O tratamento com 17β -estradiol causa uma resposta dependente da concentração que é máxima a 10 nM, esteroiespecífica, rápida (em 5 minutos) e transitória (Ivanova et al., 2001). Kipp et al (2006) propuseram que uma subpopulação de astrócitos mesencefálicos expressa RE α membranares, que estimulam a via das MAPK em resposta à ligação de estradiol. A activação desta via faz com que o modulador do receptor de estrogénios de acção não genómica

(MNAR), uma proteína envolvida no efeito não clássico do estrogénio e existente nos astrócitos do mesencéfalo embrionário, se ligue ao $ER\alpha$ membranar, estimulando a expressão e a libertação de GDNF pelos astrócitos (figura 6). O GDNF, por sua vez, vai estimular os astrócitos vizinhos a produzir transportadores de glutamato, que contribuem directamente para a neuroprotecção das células dopaminérgicas da toxicidade induzida pelo glutamato (revisto por Kipp et al., 2006).

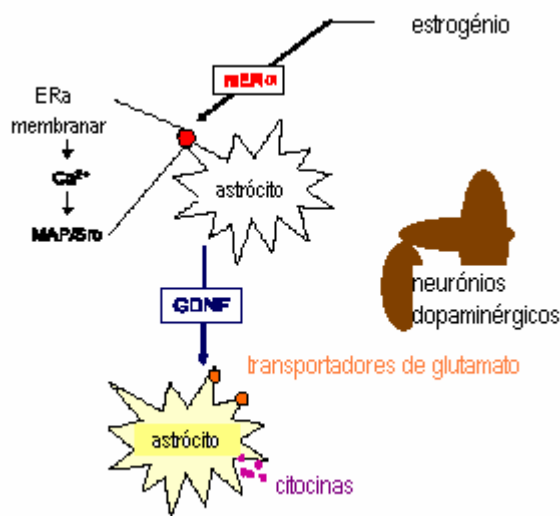


Figura 6: Esquemática da interacção do estrogénio e GDNF com os neurónios dopaminérgicos durante fases de desenvolvimento (adaptado de revisão por Kipp et al., 2006).

1.1.6.2.2. O GDNF, O H_2O_2 E A L-DOPA

Brikmayer e Horynekiewicz (2006) demonstraram que a administração intravenosa de L-DOPA, o precursor da dopamina, reverte significativamente os sintomas da DP, apesar dos efeitos serem breves. Posteriormente Cotzias (1969) demonstrou que o aumento gradual da administração oral de L-DOPA é acompanhado de benefícios contínuos e significativos. Ainda hoje se utiliza este fármaco como terapia na DP (Kandel et al., 2003).

O normal metabolismo da dopamina produz H_2O_2 , que pode gerar ROS. O incremento dos níveis de dopamina resultante da terapia com L-DOPA é, provavelmente, mais uma forma de aumentar os níveis de stress oxidativo nas células dopaminérgicas. Sabe-se que a toxicidade resultante da exposição de neurónios dopaminérgicos a H_2O_2 promove a libertação de mediadores solúveis, que induzem a expressão de GDNF pelos astrócitos (Saavedra et al, 2006). Por outro lado,

sabe-se que os efeitos tróficos da L-DOPA nos neurónios dopaminérgicos da SN são mediados, em parte, pela regulação da expressão do GDNF (Mena et al., 1997; Merrer et al., 1998). A L-DOPA e o H_2O_2 , em concentrações na ordem dos μM , estimulam a produção de GDNF em culturas mistas de SN mas não em culturas apenas de astrócitos. Este facto sugere que os neurónios têm um papel importante na estimulação de GDNF. Os neurónios podem regular essa produção por si só ou estimular as células gliais a produzir e libertar GDNF. Apesar da estimulação da produção de GDNF ser efectuada tanto por H_2O_2 como por L-DOPA ela parece ser mediada por diferentes mecanismos (Saavedra et al., 2006).

O GDNF é localmente expresso na SN e este efeito trófico perto do corpo do neurónio é importante quando há degeneração dos terminais dopaminérgicos no estriado comprometendo a transporte retrógrado do GDNF estriatal. Tanto em modelos experimentais de DP como na DP, a perda intensiva de neurónios dopaminérgicos está associada à reacção glial causada essencialmente por activação da microglia e, em menor escala por activação dos astrócitos. A microglia activada liberta para o meio várias moléculas pró-inflamatórias e ROS. Esta resposta glial será o passo para os factores neurotróficos mediar a neuroprotecção contra ROS (Teismann et al., 2003). Zonas cerebrais com baixa densidade de células gliais têm uma maior perda de neurónios dopaminérgicos do que zonas de alta densidade. Pensa-se que é também por esta razão que os neurónios dopaminérgicos quando lesados enviam sinais aos astrócitos para sintetizar e libertar GDNF. Por isso zonas com pouca glia terão uma menor resposta e o mecanismo da síntese e libertação de GDNF é menos eficaz.

1.2. A DOENÇA DE PARKINSON (DP)

A doença de Parkinson (DP), descrita por James Parkinson em 1817, afecta cerca de 1 a 2% da população europeia com mais de 65 anos. Os principais sintomas desta doença incluem a lentidão dos movimentos espontâneos, acinésia, bradicinésia, rigidez muscular, tremor, confusão, postura flectida e ausência de expressão facial. A DP foi a primeira patologia a ser demonstrada como um distúrbio cerebral resultante da deficiência de um único neurotransmissor – a dopamina. Na década de 1950, Arvid Carlson mostrou que 80% da dopamina cerebral se localiza nos gânglios da base. Posteriormente, Oleh Hornykiewicz mostrou que os cérebros de doentes com DP eram deficitários em dopamina no estriado, principalmente na zona do *putamen*. Na década de 1960,

demonstrou-se que a DP era resultado da degeneração de neurónios dopaminérgicos na SN *pars compacta*, o que reduz severamente a libertação de dopamina no *putamen* (Kandel et al., 2003).

Ao nível molecular, as amostras *postmortem* de neurónios dopaminérgicos nigroestriais de indivíduos com DP mostram inclusões citoplasmáticas de proteínas intraneuronais (α -sinucleína e ubiquitina) conhecidas por corpos de Lewy (revisto por Dauer et al., 2003)

1.2.1. O SISTEMA NIGROESTRIATAL

A dopamina é um neurotransmissor monoaminérgico sintetizado a partir da tirosina. A enzima tirosina hidroxilase (TH) converte a tirosina em L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e posteriormente a DOPA descarboxilase converte a L-DOPA em dopamina. Nos neurónios a dopamina é armazenada em vesículas sendo depois libertada quando a célula é estimulada. A acumulação de dopamina no interior da vesícula é feita por um transportador da membrana vesicular (VMAT). A dopamina libertada pode ser recaptada para o terminal nervoso através da acção de um transportador de alta afinidade presente na membrana pré-sináptica (DAT) (figura 7) (Kandel et al., 2003).

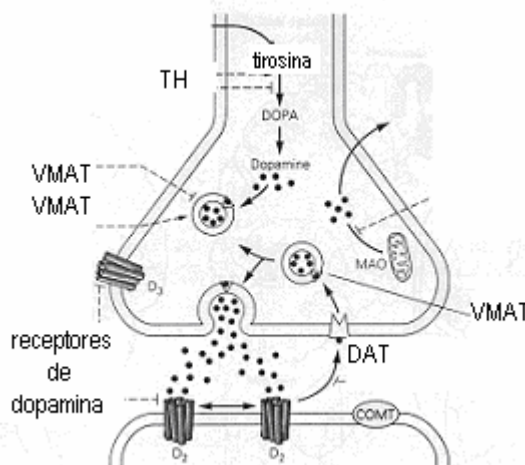


Figura 7: Representação do metabolismo e transporte da dopamina (adaptado de Cooper et al., 1996).

Os neurónios dopaminérgicos não se localizam uniformemente distribuídos pelo cérebro, mas sim agrupados em 4 sistemas dopaminérgicos principais: a via nigroestriatal, a via mesolímbica, a via mesocortical e a via do núcleo arcuado ou tuberoinfundibular (revisto por Kipp et

al., 2006). Na via nigroestriatal o corpo celular dos neurónios dopaminérgicos situa-se na SN e os axónios projectam-se para o estriado dorso-lateral, correspondente ao putamen-caudado nos humanos (revisto por Kipp et al., 2006) (figura 8). Estes neurónios regulam de uma forma geral a integração motora, a função hormonal neuroendócrina, a actividade sexual, a cognição, o comportamento emocional e o sentido da recompensa (revisto por Kipp et al., 2006).

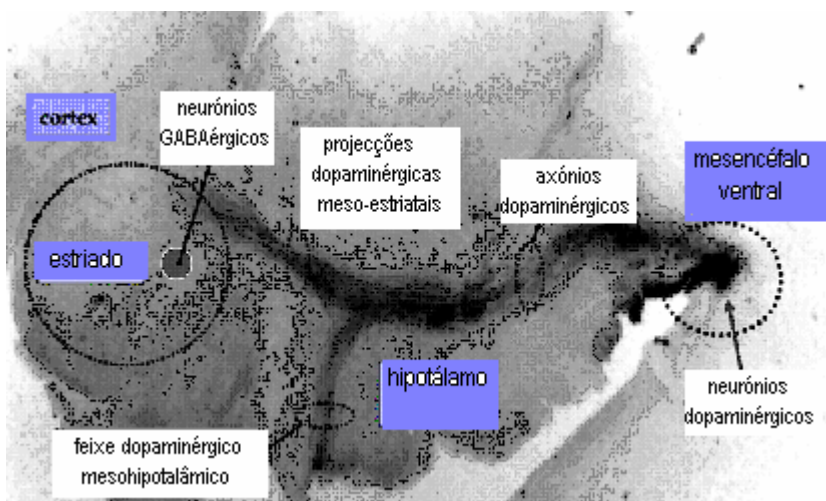


Figura 8: Secção parassagital de embrião de rato onde está evidenciada a escuro a via dopaminérgica nigroestriatal (adaptado de Reisert, 1990).

Os gânglios da base (figura 9) consistem em 4 núcleos que participam no controlo dos movimentos voluntários. Recebem estímulos maioritariamente do córtex cerebral e do tálamo e enviam estímulos de novo para o córtex através do tálamo e para o bulbo. Os gânglios da base são o estriado (núcleo caudado e putamen), o globo pálido, a SN (*pars compacta* e *pars reticulata*) e os núcleos subtalâmicos. O estriado é o núcleo que recebe mais estímulos do córtex cerebral, do tálamo e do bulbo e os seus neurónios projectam-se para o globo pálido e para a SN *pars reticulata* (Kandel et al., 2003).

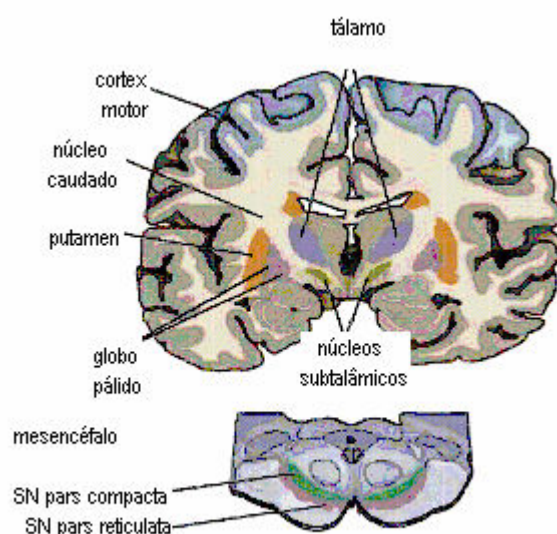


Figura 9: Representação dos gânglios da base (adaptado de Kandel et al., 2003).

Existem duas vias estriatais que são afectadas de forma diferente pelas projecções dopaminérgicas da SN *pars compacta* em virtude dos neurónios estriatais terem diferentes tipos de receptores de dopamina. Os neurónios estriatais implicados na via estriatal directa têm receptores de dopamina D1, enquanto que os neurónios estriatais implicados na via indirecta têm receptores de dopamina D2. Apesar das acções sinápticas serem diferentes, o efeito das duas vias é o mesmo: reduzir a inibição dos neurónios talamocorticais facilitando os movimentos iniciados no córtex. Desta forma percebe-se como a depleção de dopamina no estriado, característica na DP, interfere com os movimentos. Sem a acção dopaminérgica no estriado, a actividade nos outros núcleos basais aumenta, o que promove a inibição dos neurónios talamocorticais e dificulta a iniciação dos movimentos (Kandel et al., 2003) (figura 10).

DP (hipocinésia)

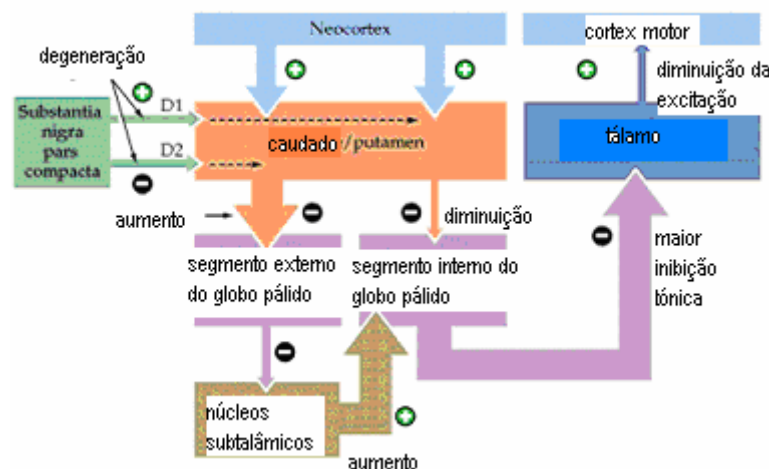


Figura 10: Representação do que ocorre ao nível dos gânglios da base na DP devido à depleção de dopamina no estriado (adaptado de Kandel et al., 2003).

1.2.2. CAUSAS DA DP

A perda de neurónios dopaminérgicos da SN característica da DP não tem uma causa concreta e definida, tendo como causas gerais primárias factores genéticos e ambientais, excitotoxicidade ou traumatismo cerebral (Bower et al., 2003) e como causas secundárias o stress oxidativo, alterações metabólicas e a apoptose despoletada pelo stress oxidativo (Wallace et al., 2006; Sawada et al., 1998).

As raras formas hereditárias de DP derivam de mutações em pelo menos quatro genes, incluindo o gene codificante da α -sinucleína (PARK1), da parquína (PARK2), da proteína DJ-1 (PARK7) e da proteína PTEN (PARK6 ou PINK1) (Boss-Wetzel et al., 2004; Ross et al., 2004).

Como já referido, a etiologia do Parkinson continua pouco clara, mas a componente ambiental é claramente indicada como causa accidental. Certos estudos epidemiológicos sugerem uma correlação entre a exposição a pesticidas e o aumento dos riscos desta doença, que será maior se a exposição for a mais do que um pesticida (Newhouse et al., 2004; Uversky et al., 2004). Os inúmeros estudos efectuados apontam como principais pesticidas envolvidos na DP o herbicida paraquato (Manning-Bog et al., 2002), o fungicida maneb (Thiruchelvam et al., 2000), e os insecticidas rotenona (Betarbet et al., 2000), dieldrine (Kitazawa et al., 2001) e lindano (Corrigan et al., 2000), todos com grande capacidade para produzir ROS (Jenner et al., 1998). Estudos

efectuados com doses sub-agudas do insecticida rotenona administradas a ratos resultaram em alterações bioquímicas, anatómicas e comportamentais semelhantes às observadas na DP. A rotenona induz a formação de depósitos proteicos que resultam em corpos de Lewy e inibe o complexo I mitocondrial nos neurónios dopaminérgicos (Bossy-Wetzel et al., 2004).

O contacto accidental com 1-metil-4-pfenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), um contaminante de drogas de abuso é mais umas das possíveis causas da DP. O MPTP é metabolizado pelos astrócitos em 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) e posteriormente internalizado para os neurónios dopaminérgicos por DATs. Nos neurónios interage com a mitocôndria, onde inibe o complexo mitocondrial I e promove a produção de ROS (Newhouse et al., 2004).

As duas principais hipóteses de causas secundárias para a perda neuronal selectiva na DP são a incorrecta conformação e agregação das proteínas nos neurónios dopaminérgicos da SN, bem como a disfunção mitocondrial e o consequente stress oxidativo (Cohen et al., 1984).

Alterações na homeostase dos metais pode também estar envolvida na etiologia da DP, principalmente no que diz respeito ao ferro que existe em níveis elevados na SN. O anormal metabolismo da ferritina neste local pode ser responsável pela elevação dos níveis de ferro que se observa nesta zona. Sendo o ferro um catalisador da produção do radical hidroxilo, um aumento nos níveis deste metal vai favorecer o produção de ROS e de stress oxidativo (Bossy-Wetzel et al., 2004).

A falência mitocondrial e a consequente depleção de ATP são uma forma comum dos processos apoptóticos e necróticos. Como a função mitocondrial representa um mecanismo que estabiliza o metabolismo energético e defende as células da morte, uma disfunção ao nível da integridade mitocondrial pode estar associada à DP. Estudos indicam que a perda selectiva da actividade do complexo I mitocondrial na SN pode estar associada à DP (revisto por Kipp et al., 2006).

A importância da expressão de DATs no desenvolvimento da DP é desconhecida, mas sabe-se que os neurónios dopaminérgicos da SN de indivíduos com DP expressam níveis mais elevados de DATs do que indivíduos saudáveis. Os DATs para além de regularem as sinapses dopaminérgicas também promovem a entrada de neurotoxinas estruturalmente semelhantes à dopamina (Nass et al., 2003).

Pensa-se que os mecanismos responsáveis pela morte dos neurónios dopaminérgicos na doença de Parkinson podem ser tanto apoptóticos como necróticos. O mecanismo causador da morte celular parece depender da toxina à qual as células ou os animais foram expostos.

Maioritariamente, a dopamina e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) induzem apoptose, o MPP⁺/MPTP induz necrose e o pesticida rotenona parece induzir ambas as vias (Lotharius et al., 1999).

1.2.3. A PD E O STRESS OXIDATIVO

O normal metabolismo da dopamina por auto-oxidação resulta na produção de ROS, nomeadamente peróxido de hidrogénio e radical superóxido. O peróxido de hidrogénio por si só não é muito lesivo, mas pode ser facilmente convertido no radical hidroxilo pela reacção de Fenton-Haber-Weiss catalisada por metais de transição como o ferro e o cobre. O radical hidroxilo é muito reactivo, podendo lesar ácidos nucleicos e proteínas e iniciar a reacção de peroxidação lipídica, que conduz a alterações na fluidez membranar. O superóxido pode reagir com o NO e promover a formação do radical peroxinitrilo, que se pode decompor em radicais hidroxilo ou interagir com grupos tiol e resíduos de tirosina (Radi et al., 1991).

Existem nos sistemas biológicos mecanismos de defesa antioxidantes, o que faz com que as lesões causadas pelas ROS sejam controladas. De entre os mecanismos de defesa antioxidantes podem destacar-se os não enzimáticos (glutathione, vitamina C e vitamina E) e os enzimáticos. A superóxido dismutase (SOD) acelera a conversão do superóxido em H₂O₂, e as enzimas catalase e glutathione peroxidase (GSH Px) convertem o H₂O₂ em H₂O (Buckman et al., 1993; Makar et al., 1994).

O desequilíbrio entre a acção dos oxidantes e dos antioxidantes celulares, no sentido pró-oxidante, define o stress oxidativo, que pode ser responsável pelo aparecimento de várias doenças neurodegenerativas, nomeadamente a DP. Neste contexto, a própria dopamina pode ser considerada uma neurotoxina endógena, devido à morte selectiva dos neurónios que produzem dopamina. As duas enzimas antioxidantes acima referidas existem na SN e os seus níveis diminuem com a idade, mas mais acentuadamente na DP. A diminuição dos níveis destas enzimas possibilita a acumulação de ROS que resulta num aumento dos níveis de stress oxidativo e na promoção da destruição das células dopaminérgicas (Nass et al., 2003).

Estudos *postmortem* em indivíduos com DP, mostraram existir um desequilíbrio entre a produção de ROS e a sua eliminação. Na SN de indivíduos com DP observou-se um aumento dos níveis de ferro, que como já foi referido, catalisa a conversão do H₂O₂ em radical hidroxilo, e ainda uma diminuição dos níveis de GSH (Nass et al., 2003).

1.2.4. OS TRATAMENTOS PARA DP

Actualmente não existe cura para a DP, mas medicação ou cirurgia podem reverter os sintomas. O medicamento mais utilizado é a L-DOPA mas frequentemente são também usados agonistas dos receptores de dopamina (bromocriptine, pergolida, pramipexole, etc.) e inibidores da monoaminoxidase (MAO) (selegilina e rasagilina).

A L-DOPA é um aminoácido precursor da dopamina usada no tratamento sintomático de Parkinson desde há cerca de 40 anos. Ao contrário da dopamina, a L-DOPA é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo posteriormente captada pelos neurónios dopaminérgicos da SN onde é convertida em dopamina. Apesar de ser esta a terapia mais utilizada no tratamento da DP, o seu efeito vai decaindo após 4 a 5 anos de utilização, devido à estimulação frequente dos receptores dopaminérgicos com doses de dopamina superiores às fisiológicas (Nass et al., 2003).

Apesar da L-DOPA ser o tratamento sintomático mais eficaz para casos de DP, existe controvérsia sobre o seu papel na degeneração dos neurónios dopaminérgicos e na progressão da doença, pois a perda progressiva de neurónios continua a ocorrer mesmo com a terapêutica. De facto, alguns estudos sugerem que a oxidação da L-DOPA através da via dopaminérgica causa danos neuronais. Tal como a dopamina, a L-DOPA também pode ser tóxica para os neurónios, estando demonstrada essa toxicidade em neurónios dopaminérgicos em cultura. Pensa-se que essa toxicidade é resultado da auto-oxidação da L-DOPA ao produzir H_2O_2 , OH , O_2^- e quinonas (Boss-Wetzel et al., 2004). Em contraste, estudos indicam que a L-DOPA não exerce toxicidade em neurónios dopaminérgicos *in vivo*, pois o tratamento crónico com L-DOPA não afecta a sobrevivência dos neurónios dopaminérgicos da SN pars compacta em ratos normais (Hefti et al., 1981), primatas (Zeng et al., 2001) e humanos (Quinn et al., 1986). No entanto, nestes estudos os mecanismos de defesa oxidativa foram preservados e não existiam evidências de stress oxidativo na SN. Esta situação pode ser diferente da que acontece na DP, onde há evidências de dano oxidativo a proteínas, lípidos e DNA, aumento da concentração de ferro, o qual promove reacções oxidativas, e decréscimo de GSH, um importante antioxidante existente no cérebro (Perry et al., 1982). O mecanismo de toxicidade da L-DOPA *in vitro* é atenuado pelas células da glia, porém os neurónios dopaminérgicos nigroestriatais estão normalmente rodeados por baixa densidade deste tipo de células tornando-os mais susceptíveis à toxicidade da L-DOPA (Makar et al., 1994).

1.2.5. MODELOS EXPERIMENTAIS DE DP

Várias neurotoxinas são utilizadas para induzir neurodegeneração dopaminérgica, nomeadamente 6-OHDA, MPTP, paraquato e rotenona. Todas estas toxinas provocam a formação de ROS. A rotenona e o MPTP têm a capacidade de inibir o complexo I mitocondrial e a exposição a MPTP resulta claramente em Parkinsonismo (revisto por Dauer et al., 2003).

1.2.5.1. 6-OHDA

A lesão com 6-OHDA da via nigroestriatal é utilizada como modelo para a DP, pois é um metabolito endógeno e neurotóxico da dopamina que causa e/ou contribui para a doença (revisto por Nass et al., 2003). A 6-OHDA aumenta os níveis de H_2O_2 e ROS. Os ROS são produzidos pela degradação não enzimática da 6-OHDA e/ou da inibição directa dos complexos I e IV da cadeia transportadora e electrões da mitocôndria. A produção de ROS promove a peroxidação lipídica, a desnaturação proteica, e um decréscimo dos níveis de glutathione reduzida, marcas também observadas em cérebros *postmortem* de pacientes com DP (revisto por Nass et al., 2003).

De entre os grupos de neurónios dopaminérgicos do mesencéfalo ventral, os neurónios da SN são os mais sensíveis à 6-OHDA. Estudos indicam que essa especificidade se deve ao elevado número de DATs que a SN tem e à elevada afinidade que os transportadores têm para a 6-OHDA (Nass, R. et al., 2003). Dentro dos neurónios, a 6-OHDA acumula-se no citosol e forma ROS e quinonas que lesam grupos nucleofílicos (revisto por Dauer et al., 2003). Devido ao facto da 6-OHDA não atravessar a barreira hematoencefálica, a sua administração *in vivo* tem de ser efectuada através de injeções esterotáxicas locais. Quando a injeção é feita no estriado, a 6-OHDA produz uma neurodegeneração nigroestriatal retrógrada após uma a três semanas. Caso a lesão seja na SN, a neurodegeneração inicia-se 24 horas após a injeção (revisto por Dauer et al., 2003).

1.2.5.2. PARAQUATO

Paraquato é a designação para o herbicida N,N'-dimetil-4,4'-bipiridilo também utilizado em modelos de DP. O paraquato tem uma estrutura similar ao MPP⁺, existe no ambiente e a sua exposição aumenta o risco de desenvolver DP (Liou et al., 1997). A toxicidade do paraquato está relacionada com a formação de radicais superóxido e a sua administração sistémica em ratos resulta em neurodegeneração dopaminérgica da SN acompanhada pela presença de corpos de Lewy nos neurónios (revisto por Dauer et al., 2003).

1.2.5.3. ROTENONA

A Rotenona é o mais potente dos rotenóides, uma família de citotóxicos naturais extraído de plantas tropicais e usada como insecticida e piscicida. A rotenona é muito lipofílica e por isso atinge facilmente os organelos da célula, nomeadamente a mitocôndria onde inibe o complexo I. A administração intravenosa de baixas doses de rotenona em ratos provocou a degeneração selectiva de neurónios dopaminérgicos nigroestriatais acompanhada de inclusões de corpos de Lewy (revisto por Dauer et al., 2003). Experiências em linhas celulares de neurónios dopaminérgicos humanos demonstraram que a morte dos neurónios pela rotenona envolve a apoptose mediada por p38, JNK e MAPK (Newhouse et al., 2004).

1.2.5.4. MPTP

A exposição humana a MPTP, um contaminante existente em drogas de abuso, resulta em estados avançados de DP (Kandel et al, 2003). Em 1982, um indivíduo desenvolveu de forma rápida uma síndrome parkinsónica ao injectar de forma intravenosa uma preparação com MPTP, um análogo ao narcótico meperidina. Em humanos e macacos, o MPTP produz uma síndrome parkinsónica irreversível e severa caracterizada pelos sintomas e sinais da DP. Macacos tratados com doses reduzidas de MPTP exibem preferencialmente degeneração nos terminais nervosos

dopaminérgicos no estriado. Da mesma forma, o MPTP lesa as vias dopaminérgicas de uma forma similar ao ocorrido na DP, incluindo uma perda massiva de células na zona ventral e lateral da SN *pars compacta*. Os neurónios dopaminérgicos que contêm neuromelanina e presentes em grande quantidade na SN são mais susceptíveis à degeneração induzida por MPTP. A neuromelanina contribui para a neurodegeneração que existe na DP e para a toxicidade induzida com MPTP, por catalizar a formação de ROS através da interacção do ferro que existe na neuromelanina (revisto por Dauer et al., 2003).

A descoberta dos efeitos da exposição a MPTP indicou que toxinas exógenas podem estar associadas à DP e o seu uso em primatas não humanos permitiu desenvolver um modelo da DP. (Kandel et al., 2003).

1.3. O ESTRADIOL E A DP

Diversas evidências apontam para a hipótese de os estrogénios conferirem benefícios contra a DP devido ao seu conhecido efeito antioxidante e estudos efectuados em primatas confirmaram que os estrogénios são essenciais para a manutenção dos neurónios nigroestriatais (Cyr et al., 2002). Na maioria, mas não em todos os estudos epidemiológicos, a DP afecta um maior número de homens do que de mulheres (Biewenga et al., 2005; Wallace et al., 2006; Sawada et al., 1998), a progressão da doença é mais rápida em homens e a terapia clássica com L-DOPA é também menos eficaz nos homens. O motivo desta diferença entre ambos os géneros é desconhecido mas pensa-se que os estrogénios estejam envolvidos (Green et al., 1997; Cyr et al., 2002). Esta ideia foi sugerida por experiências onde, utilizando ratinhos machos, os estrogénios reduziram significativamente a perda de neurónios dopaminérgicos causada por MPTP e metanfetaminas (Cyr et al., 2002; Biewenga et al., 2005). Experiências com ratas saudáveis demonstraram que estas têm uma maior densidade de células dopaminérgicas que machos ou fêmeas ovariectomizadas e que o estradiol quando rapidamente repostado, consegue prevenir a perda neuronal causada pela ovariectomia (Cyr et al., 2002).

Os estrogénios têm mostrado modular os sintomas de DP e a discinésia induzida por L-DOPA. Estudos baseados nos efeitos da terapia com L-DOPA em doentes com DP, submetidos simultaneamente à terapia estrogénica, indicam que estes suportam muito melhor os efeitos anti-dopaminérgicos da doença. Outros estudos sugerem que a terapia estrogénica tem maiores

benefícios, nomeadamente na evolução da demência, em mulheres com DP recente e antes de iniciarem a terapia com L-DOPA (Cyr et al., 2002). Estes factos levam a pensar na utilização de compostos com actividade estrogénica cerebral como potenciais terapias neuroprotectoras. Devido ao facto do 17β -estradiol conferir neuroprotecção através de vários mecanismos, é importante determinar quais as substâncias que mimetizam e inibem os seus efeitos, nomeadamente nos neurónios da SN implicados na DP (Biewenga et al., 2005).

Apesar dos estudos da neuroprotecção exercida pelo 17β -estradiol serem controversos, é apontada muitas vezes a terapia estrogénica de substituição para as doenças neurodegenerativas. No entanto, esta terapia não pode ser utilizada em doentes homens devido aos indesejados efeitos secundários. Por isso é importante conhecer formas de modular as respostas obtidas com os estrogénios para utilizar moléculas que alterem vias específicas sem induzir respostas não desejadas.

1.4. MODELO EXPERIMENTAL

A capacidade do estradiol impedir a neurodegeneração está bem documentada em estudos recentes que sugerem que os factores neurotróficos contribuem para esse efeito (Behl et al., 2002). No presente trabalho foram utilizados dois modelos experimentais. Um dos modelos utilizou animais vivos onde se estudou o efeito de estradiol numa lesão cerebral, e o outro utilizou culturas celulares primárias de animais da mesma espécie aos utilizados no modelo *in vivo* onde se verificou o efeito da pré-incubação das culturas com estradiol em estímulos posteriores.

1.4.1. ESTUDOS *IN VITRO*

As culturas de células animais apresentam algumas vantagens em relação aos modelos animais e estudos humanos. Assim, nessas condições, há maior possibilidade de controlar as condições experimentais, o que facilita a interpretação dos resultados. De igual forma, requer pequenas quantidades das substâncias em estudo e a sua utilização é eticamente menos discutível. No entanto, apresentam algumas desvantagens, tais como a perda progressiva do grau de

diferenciação das células e a incapacidade de reproduzir as condições do organismo, pelo que as respostas obtidas não são totalmente representativas da situação *in vivo*.

As culturas celulares utilizadas neste estudo tiveram origem na SN de ratos Wistar recém-nascidos. Estas culturas estão documentadas como tendo a capacidade de expressar GDNF – a proteína que se pretende quantificar nos extractos celulares após os ensaios (Ding et al., 2004; Saavedra et al., 2005) e responderem com aumentos da expressão de GDNF a estímulos de L-DOPA e H₂O₂ (Saavedra et al., 2005). Devido ao facto de serem compostas simultaneamente por astrócitos e neurónios reproduzem de forma mais aproximada as condições da SN dos modelos *in vivo*.

1.4.2. ESTUDOS *IN VIVO*

A utilização de animais como modelo experimental permite reproduzir as condições do organismo, pelo que as respostas obtidas são mais próximas da situação real. Os animais utilizados neste modelo experimental foram ratos Wistar adultos machos que, segundo estudos anteriores, respondem de forma retrógrada à lesão utilizada (6-OHDA no estriado) (Rodrigues et al., 2003). Isto significa que uma lesão com 6-OHDA no estriado resulta em perda de neurónios dopaminérgicos da SN.

1.4.3. MARCADORES CELULARES

Existem determinadas proteínas que são expressas unicamente por um tipo ou população celular. Estes marcadores celulares permitem reconhecer e diferenciar tipos celulares. Os marcadores celulares utilizados neste estudo foram a tirosina hidroxilase (TH), como marcador de células dopaminérgicas, e a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), como marcador de astrócitos.

1.4.4. OBJECTIVOS E DESENHO EXPERIMENTAL

A capacidade neuroprotectora do estradiol é claramente reconhecida e os factores neurotróficos têm sido indicados como participantes desse efeito. Neste estudo propomos estudar a relação entre o efeito do estradiol na protecção dos neurónios dopaminérgicos de lesões tóxicas e a expressão do GDNF. Com este estudo pretende-se clarificar se o estradiol tem efeito na expressão do GDNF no sistema nigroestriatal *in vivo* e *in vitro*, quais as células alvo da acção do estradiol e identificar os receptores, membranares e/ou intracelulares, envolvidos na regulação da expressão do GDNF por estradiol.

In vitro, em culturas celulares de SN, estudou-se o efeito de uma gama de diferentes concentrações de estradiol na expressão do GDNF. Para determinar se esse efeito era mediado por receptores de estrogénio e qual a sua localização, estudamos o efeito do estradiol utilizando antagonistas selectivos de receptores de estrogénio intracelulares e uma forma não permeável do estradiol. Para clarificar se existe acção do estradiol no efeito da L-DOPA e do H₂O₂ na expressão do GDNF, utilizaram-se diferentes concentrações de estradiol e posteriores estímulos com L-DOPA ou H₂O₂. Nos estudos *in vitro* os níveis de GDNF foram determinados por Western-Blot e a caracterização celular foi feita por citometria de fluxo.

In vivo, o efeito do estradiol nos níveis de GDNF foi avaliado em ratos Wistar machos. O 17β-estradiol foi administrado aos animais através de cápsulas subcutâneas, 10 dias após a implantação das cápsulas os animais foram injectados no estriado com 6-OHDA, sendo sacrificados 5 dias após a administração desta toxina. Nos cérebros efectuaram-se cortes coronais e, por imunohistoquímica, analisaram-se as marcações para GDNF e TH na SN e no estriado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ENSAIOS *IN VITRO*

2.1.1. PREPARAÇÃO DE CULTURAS MISTAS DE ASTRÓCITOS E DE NEURÓNIOS DA *SUBSTANTIA NIGRA*

2.1.1.1. CULTURA DE ASTRÓCITOS

Para cada preparação de astrócitos utilizaram-se entre 10 a 15 ratos Wistar com idades entre 1 a 3 dias. Anestesiaram-se individualmente os animais com 0,05 ml de 100mg/mL de cetamina através de uma injeção intraperitoneal e foram colocados em gelo. Preparou-se a solução de digestão¹ enzimática e borbulhou-se com carbogénio durante 30 minutos a 37°C sob agitação constante. Decapitaram-se os animais, retiraram-se os cérebros e colocaram-se numa caixa de Petri com PBS² frio. Dissecou-se a zona correspondente à SN, dividiu-se em porções com cerca de 1mm³ que se colocaram em PBS².

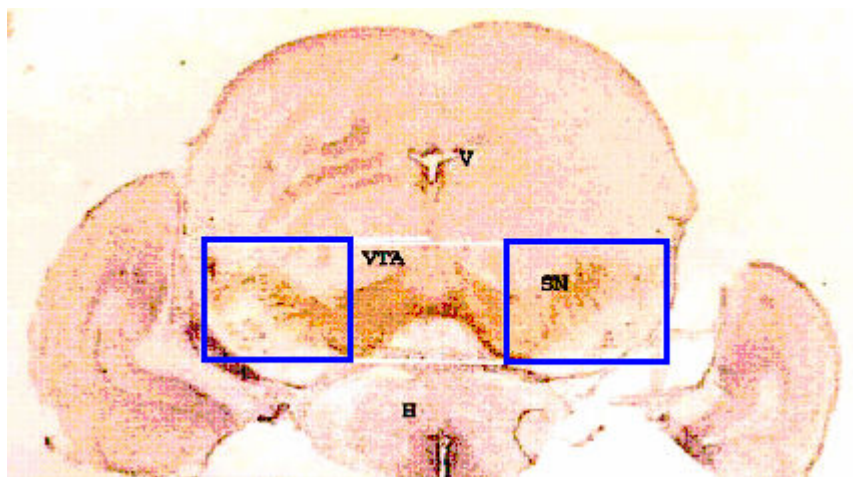


Figura 11: Secção coronal de rato que define a azul a zona pretendida para dissecção – a *substantia nigra* (SN). VTA: área tegmental ventral.

Os pedaços obtidos dividiram-se pelos tubos de falcon contendo a solução de digestão¹ e foram sujeitos a digestão, a 37°C, durante cerca de 15 minutos. Terminada a digestão, a suspensão foi transferida para tubos de centrifuga de 15 ml e centrifugou-se durante 1 minuto a 700 xg. Removeu-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento 3 vezes com M10C-G³ a 37°C. Centrifugou-se de novo a suspensão durante 1 minuto a 700 xg e retirou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento com pontas com calibres 20 g, 23 g e 25 g sequencialmente. Obteve-se um sedimento após centrifugação da suspensão durante 3 minutos a 1500 xg. O sedimento assim obtido foi ressuspenso em M10C-G³. Fez-se uma diluição 1:1 da última suspensão obtida com azul de tripan⁴ e a partir dessa diluição contaram-se as células viáveis numa câmara de Neubauer utilizando os quatro quadrantes representados e assinalados na figura 12.

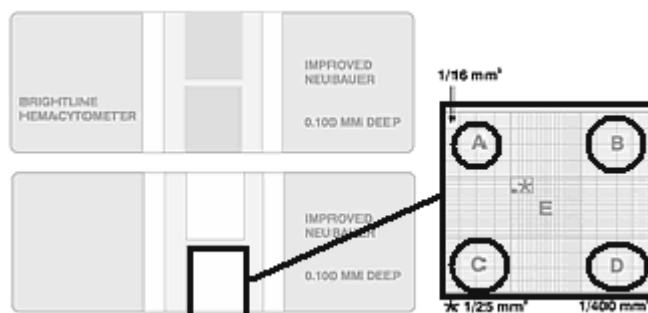


Figura 12: Representação da câmara de Neubauer. Os círculos indicam as zonas de contagem das células.

A partir da média do número de células por quadrante contadas nos quatro quadrantes diluiu-se a suspensão em M10C-G³ de forma a obter uma densidade celular de $0,356 \times 10^6 / 3,8 \text{ cm}^2$ e as células foram cultivadas em placas revestidas com poli-D-Lisina (0,1mg/ml). Finalmente

1: solução de digestão para preparação de astrócitos: água de cisteína 1 mM, papaina 1,2 mg/ml (Sigma), HeB a 20%, vermelho de fenol a 0,001%.

Água de cisteína: CaCl_2 1,9 mM, cisteína 1,3 mM.

HeB: NaCl 116 mM, KCl 5,4 mM, NaHCO_3 26 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM, EDTA 500 μM , glucose 25 mM.

2: PBS: NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM.

3: M10C-G: MEM (Eagle Minimum Essential Medium) 900 ml/L, soro de vitela não inativado pelo calor 100 ml/L (Gibco), glicose a 0,34%, solução de penicilina/estreptomicina 1,2 ml/L, insulina 5 mg/l, glutamina 0,073 g/L.

4: azul de tripan a 0,4% (Merck) em NaCl a 0,9%.

colocou-se a placa com a suspensão celular na incubadora a 37°C, numa atmosfera com 5% de CO₂. Aproximadamente uma hora após a cultura, foi efectuada uma lavagem com o objectivo de remover restos celulares presentes. Para tal aspirou-se o meio de cada poceto tendo o cuidado de não raspar a superfície da placa e adicionou-se 1ml de MEM⁵ frio em cada poceto. Repetiram-se os passos, aspirou-se o MEM⁵ de cada poceto e adicionaram-se 2 ml de M10C-G³ a 37°C. Quando os astrócitos em cultura atingiram cerca de 70% de confluência, inibiu-se o seu crescimento com 5-fluorodesoxiuridina (FDU)⁶.

2.1.1.2. CULTURA DE NEURÓNIOS

Todo o processo de preparação de neurónios foi igual ao da preparação de astrócitos com excepção da solução de digestão para preparação de neurónios⁸ e do M10C-G ser substituído por meio neurobasal com soro (MNBS)⁷. A densidade celular utilizada foi de $0,38 \times 10^6$ / 3,8 cm².

Vinte e quatro horas antes de preparar a cultura de neurónios substitui-se o meio M10C-G³ das culturas de astrócitos por 1ml de meio neurobasal com soro⁷ por cada poceto. Os neurónios foram cultivados sobre uma monocamada de astrócitos. A cultura mista de astrócitos e neurónios foi utilizada nos ensaios três dias após a sua preparação.

2.1.2. TRATAMENTO DAS CULTURAS

As culturas mistas de astrócitos e neurónios da SN foram expostas a diversos estímulos, nomeadamente 17β-estradiol (E₂), H₂O₂, L-DOPA (L), ICI 182,780 (ICI) e 17β-estradiol conjugado a albumina sérica bovina (E:BSA). Em todas as culturas, incluindo as culturas controlo, foi substituído o meio MNBS⁷ por meio neurobasal sem soro (MNB)⁹ aproximadamente 8 horas antes do tratamento. Na figura 11 está esquematizado o tratamento das culturas celulares.

5: MEM: MEM M0268 9,6 g/L (Gibco), vermelho de fenol a 0,2%, NaHCO₃ 2,2 g/L, pH 7,2.

6: Solução de FDU: uridina 16,5 µg/ml (Sigma), FDU 6,7 µg/ml (Aldrich).

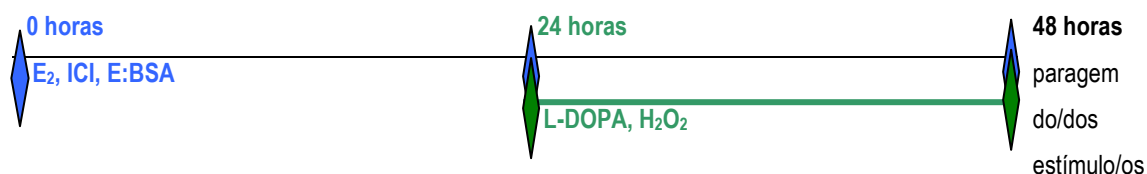


Figura 13: Tratamento das culturas mistas de SN em função dos tempos de incubação de cada condição.

- 17 β -ESTRADIOL (E₂)

As culturas celulares foram expostas durante 48 horas a 3 concentrações diferentes de 17 β -estradiol (Sigma), nomeadamente 1nM (E1), 10nM (E10) e 100nM (E100). A solução de 17 β -estradiol foi preparada em etanol numa concentração de 10 mM. Todas as soluções posteriores foram preparadas por diluições em MEM⁵.

- ICI 182,780

As culturas celulares foram incubadas durante 48 horas com 10 μ M de ICI 182,780 (Tocris). De referir que nos grupos em que houve estimulações conjuntas de ICI e E₂, o ICI foi adicionado 5 minutos antes da adição do 17 β -estradiol, para garantir que quando a hormona entrasse em contacto com as células os RE intracelulares já estariam bloqueados. A concentração da solução primária de ICI foi de 10 mM diluída em etanol.

- 17 β -ESTRADIOL CONJUGADO A BSA (E:BSA)

As culturas celulares foram expostas durante 48 horas a 10 nM de 17 β -estradiol conjugado a BSA. A concentração da solução primária de E:BSA foi de 33,3 μ M (Sigma).

- L-DOPA (L200)

Após 24 horas de exposição a 17β -estradiol, as culturas foram expostas a L-DOPA 200 μ M durante 24 horas. A solução primária de L-DOPA foi diluída em 200 mM de HCl.

- H_2O_2 (H50)

Após 24 horas de exposição a 17β -estradiol, as culturas foram tratadas com H_2O_2 50 μ M durante 24 horas.

2.1.3. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE PROTEÍNA TOTAL

Após as 48 horas de incubação das culturas mistas pós-natais de SN, aspirou-se o meio e adicionou-se 30 μ l de meio de lise completo (MLC)¹⁰ a cada poceto. Raspou-se o fundo de cada poceto e aspirou-se todo o extracto celular para tubos de microcentrífuga.

Os níveis proteicos de cada amostra foram determinados pelo método de Bradford (Biorad Protein Assay) em placas de micropoccos de fundo plano com leitura de absorvância ao comprimento de onda de 595 nm.

Com os níveis de proteína determinados por amostra conseguiu-se padronizar a quantidade de amostra aplicada na electroforese em que se utilizou o volume de extracto celular correspondente a 30 μ g de proteína.

7: meio neurobasal suplementado (MNBS): suplemento B27 a 2% (Gibco), soro de vitela inactivado pelo calor a 1% (Gibco BRL), glutamato 0,4 mM (Sigma), HCL 0,5 M (Merck), quinurenato 0,05 mM (Aldrich), FDU 1x (Aldrich), solução de estreptomicina/penicilina 10 ml/L (Sigma).

8: solução de digestão para preparação de neurónios: água de cisteína 1mM, papaína 20 unidades/ml (Sigma), HeB a 20%, HCl 5 mM, vermelho de fenol a 0,001%, quinurenato 0,5 mM (Aldrich).

9: meio neurobasal sem soro (MNB): FCS a 1% (Gibco), glutamato 0,4 mM, HCL 0,5 M, quinurenato 0,05 mM (Aldrich), FDU 1x, vancomocina/estreptomicina 10 ml/L (Sigma).

2.1.4. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GDNF NOS EXTRACTOS CELULARES POR WESTERN-BLOT

Aos extractos celulares foi adicionada solução desnaturante¹¹ 1x e foram aquecidos durante 5 minutos a 100 °C. Aplicaram-se os volumes de extracto celular anteriormente determinados num gel de acrilamida com 1,5 mm de espessura. O gel de resolução foi preparado com acrilamida a 12% em Tris-HCl 0,5 M (pH 8,8) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) a 0,1%, persulfato de amónia (PSA) a 0,05% e tetrametiletilenodiamina (TEMED) a 0,05%. O gel de concentração utilizado continha acrilamida a 4%, Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8), SDS a 0,1%, PSA a 0,05% de TEMED a 0,1%. Procedeu-se à electroforese das amostras e de padrões coloridos de peso molecular conhecido a 160V durante aproximadamente 1 hora. Na electroforese que decorreu à temperatura ambiente foi usado um tampão de SDS¹².

Terminada a electroforese colocou-se o gel em tampão de electrotransferência¹³ durante 5 minutos, e activaram-se as membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) durante 5 segundos em metanol seguido de 5 minutos em água e 10 minutos em tampão de electrotransferência¹³. Efectuou-se a electrotransferência das amostras em tampão de electrotransferência¹³ a 750 mA durante aproximadamente 1 hora e a 4 °C.

Terminada a electrotransferência retiraram-se as membranas do sistema e procedeu-se ao seu bloqueio com TBST (tampão salino de Tris com Tween)¹⁴ com leite magro a 5% durante 1 hora, à temperatura ambiente e sob agitação constante.

Incubaram-se as membranas com imunoglobulinas (Igs) de coelho anti-GDNF (Santa Cruz) diluídas 1000x em TBST¹⁴ com leite magro a 1% de e azida sódica a 0,02%. A incubação foi feita durante 1 hora à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C, sob agitação constante. Após a incubação lavaram-se as membranas 3 vezes, durante 15 minutos, com TBST¹⁴. Posteriormente incubaram-se as membranas com Igs de rato dirigidas contra Igs de coelho e conjugadas a fosfatase alcalina, diluídas 20 000x (Amersham) em TBST¹⁴ com leite a 1% e azida sódica a 0,02%. A incubação com este anticorpo decorreu durante 1 hora à temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C. Terminada esta incubação lavaram-se as membranas 3 vezes, durante 15 minutos, com TBST.

10: meio de lise completo (MLC): DTT (ditiotreitól) 1mM, PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) 1mM, leupeptina 25,57 µM, Tris 25 mM, EDTA (ácido etilenoaminotetraacético) 2,5 mM, EGTA (ácido etilenoglicoltetraacético) 2,5 mM, Triton-X-100 a 0,2%.

Após as incubações com os anticorpos as membranas foram expostas ao substrato da fosfatase alcalina (ECF, GE Healthcare) durante 15 minutos. Após este tempo detectou-se a fluorescência das bandas nas membranas, no sistema *Molecular Imager Fx* (BioRad).

2.1.5. LOCALIZAÇÃO CELULAR DA EXPRESSÃO DE GDNF POR CITOMETRIA DE FLUXO

Após as 48 horas de tratamento com 17β -estradiol 100 nM das culturas pós-natais de SN, aspirou-se o meio de cada poceto e adicionou-se 1 ml de MEM⁵ a 37 °C. Aspirou-se de novo o meio e adicionou-se tripsina a 0,25% a cada poceto. Deixou-se actuar a tripsina durante aproximadamente 5 minutos a 37 °C. Inactivou-se a tripsina adicionando a cada poceto 500µl de MNB⁹. Ressuspendeu-se o conteúdo celular de cada poceto e transferiu-se para um tubo onde se levou a centrifugar durante 3 minutos a 1500 *xg*. Obteve-se um sedimento que se fixou por adição de aproximadamente 500 µl de paraformaldeído (PFA) a 4% em PBS² durante 10 minutos. Lavou-se a suspensão com PBS e centrifugou-se durante 2 minutos a 1200 *xg*. Incubou-se o sedimento durante a noite a 4 °C com agitação constante em 250 µl de solução de anticorpo primário¹⁵. Os anticorpos primários utilizados foram Igs de galinha anti-GFAP (Chemicon) e Igs de coelho anti-GDNF (Santa Cruz). Centrifugou-se a suspensão durante 2 minutos a 1200 *xg*, lavou-se com PBS e tornou a centrifugar-se. Incubou-se o sedimento durante 1 hora à temperatura ambiente sob agitação constante com a solução de anticorpo secundário¹⁶. Os anticorpos secundários conjugados (Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 647) utilizados foram Igs de cabra dirigidos contra Igs de galinha e contra Igs de coelho (Molecular Crod). Centrifugou-se a suspensão durante 2 minutos a 1200 *xg*, lavou-se com PBS e centrifugou-se novamente. Diluiu-se o sedimento em aproximadamente 1 ml de PBS e determinaram-se as populações celulares em função da dispersão frontal do feixe laser (*forward scatter*- FSC- indicador do tamanho celular), da dispersão lateral (*side scatter* -SSC- indicador da complexidade relativa da célula) e da dispersão da fluorescência para os comprimentos

11: solução desnaturante: Tris 100 mM (Sigma), glicina 10 mM, SDS (sulfato de sódio dodecil) a 4% (Biorad), ureia 8 M (Panreac).

12: tampão de electroforese: Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS (sulfato de sódio dodecil) a 0,1%.

13: tampão de electrotransferência: CAPS (ácido ciclohexilamino propanosulfónico) 10 mM (Sigma), metanol a 10% (Panreac), pH 11.

14: TBST: Tris 20 mM, NaCl 137mM, pH 7,6, Tween a 0,1%.

de onda 488 nm (células marcadas para GFAP) e 647 nm (células marcadas para GDNF). Esta aquisição foi efectuada no citómetro de fluxo BD FACSCalibur.

2.2. ESTUDO *IN VIVO*

Os estudos *in vivo* foram efectuados em ratos Wistar adultos machos mantidos em condições de temperatura e humidade controladas com ciclos diários de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão e com acesso livre a comida e água. Foram introduzidas cápsulas de libertação lenta com 17 β -estradiol (E₂) ou veículo e após 10 dias foi efectuada uma injeção local estriatal unilateral com 6-OHDA ou veículo. Após 5 dias da lesão os animais foram sacrificados e observados cortes coronais dos cérebros. A figura 14 esquematiza o tratamento dos animais em função do tempo de cada condição.

2.2.1. IMPLANTAÇÃO DAS CÁPSULAS DE LIBERTAÇÃO LENTA

Preparou-se a solução de 17 β -estradiol (Sigma) 200 μ g/ml em propilenoglicol e etanol a 0,5%. Encheu-se lentamente a cápsula (*Microosmotic pump model 1007D*, Alzet) com 80 a 100 μ L de solução de 17 β -estradiol (para o grupo E₂) ou solução veículo de propilenoglicol e etanol a 0,5% (para o grupo controlo).

15: solução de anticorpos primários para citometria de fluxo: BSA a 0,2%, TRITON-X-100 a 0,25%, FCS inactivado pelo calor a 1%, anticorpo primário diluído 500x, o volume foi pré-feito com PBS.

16: solução de anticorpos secundários para citometria de fluxo: BSA a 2%, TRITON-X-100 a 0,25%, FCS inactivado pelo calor a 1%, anticorpo secundário diluído 500x, o volume foi pré-feito com PBS.

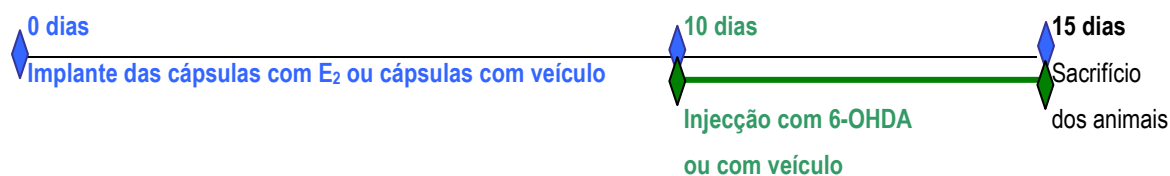


Figura 14: Tratamento dos animais em função dos tempos de cada condição.

Anestesiaram-se os ratos adultos machos com injeção intraperitoneal de xilazida (1,25 mg) e cetamina (8,75 mg) por 100 g de peso corporal. Desinfectou-se a zona de corte e com uma tesoura esterilizada fez-se uma pequena incisão na zona interescapular. Com a ajuda de uma pinça afastaram-se os tecidos e introduziu-se a cápsula correspondente ao grupo de estudo (controlo ou E₂) dentro da pele de forma longitudinal com a tampa orientada para a zona caudal. Finalmente suturou-se a zona de corte. A cápsula libertou 0,5 µL de solução por hora durante 7 dias.

2.2.2. INJEÇÃO ESTRIATAL DE 6-OHDA

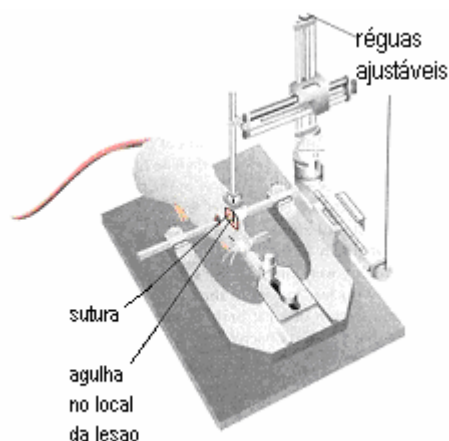


Figura 15: Mesa esterotáxica para neurocirurgia em ratos (adaptado de <http://homepage.psy.utexas.edu>).

Após 10 dias da implantação da cápsula com solução de E₂ ou veículo, anestesiaram-se os ratos com xilazida (1,25 mg) e cetamina (8,75 mg) por 100 g de peso corporal. Nesta fase retirou-se a cápsula de libertação lenta inicialmente colocada tendo os mesmos cuidados que aquando da

implantação. Colocaram-se os animais numa mesa de cirurgia esterotáxica bem fixos pelos canais auditivos e pela boca (figura 15) e com uma seringa Hamilton de 10 μ L controlada por nano-injector injectaram-se 4 μ L da solução de 6-OHDA (Sigma) 5 μ g/ μ l preparada em solução salina de ácido ascórbico 0,2 mg/ml ou o veículo, utilizando um fluxo de 0,4 μ l/min. As coordenadas para injeção foram as seguintes: profundidade 3,3 mm, 1,3 mm posteriormente e 3 mm lateralmente à direita do bregma, 4,5 mm ventralmente à dura mater. Após a injeção, a cânula foi retirada lentamente.

Após 5 dias da injeção com 6-OHDA ou solução salina de ácido ascórbico, os animais foram anestesiados e posteriormente fez-se uma perfusão transcardíaca durante 10 minutos com PBS² seguidos de outra perfusão com 200 ml de PFA a 4% em PBS.

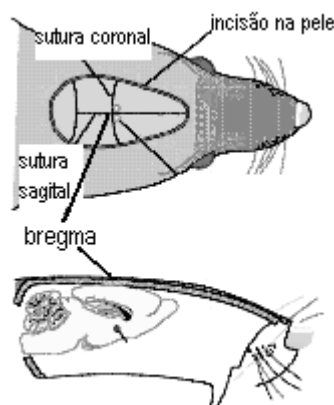


Figura 16: Relação entre as suturas cranianas e o bregma no rato (adaptado de <http://homepage.psy.utexas.edu>).

2.2.3. IMUNOHISTOQUÍMICA

▪ FIXAÇÃO

Após a perfusão dos animais, os cérebros foram extraídos e colocados durante 12 horas em PFA a 4% em PBS², seguido de três períodos de 12 horas em soluções de 10, 20 e 30% de sacarose em PBS² com 0,02% de azida sódica respectivamente.

▪ PROCESSAMENTO DOS CÉREBROS

Após a fixação dos cérebros procedeu-se à sua desidratação, colocando-os durante períodos de 1 hora em soluções de etanol a 70, 95, 95, 100, 100 e 100%. De seguida diafanizaram-se os cérebros por incubação durante períodos de 1 hora numa solução de xileno e etanol em partes iguais, e posteriormente em duas soluções de xileno. De seguida efectuou-se a inclusão dos cérebros com parafina com ponto de fusão de 58 °C. Para isso colocaram-se os cérebros em moldes individuais e preencheu-se o seu conteúdo com parafina líquida, onde foram mantidos à temperatura ambiente durante 2 horas. Voltou-se a colocar parafina líquida no espaço que entretanto se formara nos moldes e deixou-se solidificar por mais 2 horas. Retiraram-se os moldes de cada cérebro e arrefeceram-se os blocos resultantes a -18 °C durante 5 minutos.

▪ CORTE DOS CÉREBROS

Foram efectuados cortes coronais de 5 µm nas zonas correspondentes ao mesencéfalo e ao estriado num micrótomo Minot com movimento horizontal. Os cortes foram colocados em lâminas adesivadas com poli-D-lisina aquecidas a 56 °C. Posteriormente colocaram-se as lâminas na estufa a 63 °C durante 24 horas.

▪ DESPARAFINAÇÃO E HIDRATAÇÃO DOS CORTES

Colocaram-se as lâminas duas vezes em xileno durante minutos. Retirou-se o excesso de líquido e colocaram-se as lâminas duas vezes em etanol absoluto durante 3 minutos. Repetiram-se os passos para etanol a 95% e etanol a 80%. De seguida lavaram-se as lâminas em água corrente durante 30 segundos.

▪ RECUPERAÇÃO ANTIGÉNICA DOS CORTES HISTOLÓGICOS

Para que os antígenos do tecido ficassem expostos foi necessário submeter as lâminas com os cortes a um banho de tampão citrato pH 6 (ácido cítrico 2 mM e citrato de sódio 8 mM) aquecido em panela de pressão durante 1 minuto. Após este processo mantiveram-se as lâminas em água à temperatura ambiente até se proceder à fase seguinte.

▪ INCUBAÇÕES DOS CORTES COM ANTICORPOS

Colocaram-se as lâminas numa superfície plana, evitando que se tocassem e/ou secassem e adicionaram-se cerca de 25 µl de H₂O₂ a 3% de modo a cobrir toda a secção do tecido com o intuito de bloquear a actividade das peroxidases endógenas e incubaram-se nesta solução durante 5 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação com H₂O₂ lavaram-se as lâminas em PBS² com Tween a 0,05% e colocaram-se num banho, em agitação constante, durante 2 minutos. Retirou-se o excesso de líquido e aplicaram-se cerca de 25 µl de solução de anticorpo primário em cada secção de tecido (Igs de coelho anti-GDNF, D-20 SC328, Santa Cruz ou Igs de rato anti-TH, BD T20720, Transduction Laboratories, diluídos 500 ou 1000x respectivamente em PBS² com BSA a 1%). Incubaram-se os cortes durante 1 hora (ou durante a noite a 4 °C), numa câmara húmida, à temperatura ambiente. De seguida colocaram-se as lâminas num banho de PBS com Tween a 0,05%, com agitação constante, durante 5 minutos. Após as lavagens retirou-se o excesso de líquido e aplicaram-se cerca de 25 µl de solução de anticorpo secundário (Igs de cabra biotiniladas e dirigidas contra Igs de coelho (B-6648, Sigma) ou contra Igs de rato (Ab7067-100, Abcam), diluídas 20 ou 100x respectivamente em PBS² com BSA a 1%. Deixaram-se incubar os cortes durante 1 hora numa câmara húmida, à temperatura ambiente, e posteriormente lavaram-se em PBS com Tween a 0,05%. Após as lavagens incubaram-se os cortes durante 30 minutos em solução de “ExtrAvidin-Peroxidase” (*Rabbit ExtrAvidin® Peroxidase staining kit*, Sigma (E-8386)) diluída 20x em PBS com BSA a 1%. De seguida lavaram-se as lâminas num banho de PBS com Tween a 0,05%, durante 5 minutos sob agitação constante.

▪ COLORAÇÃO DOS CORTES

Dissolveu-se uma pastilha de 3,3'-diaminobenzidina (DAB, D5905-50TAB, Sigma) em 15 ml de TBS (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7,6) e adicionaram-se 12 µl de H₂O₂ a 30%. De seguida colocaram-se cerca de 25 µl desta solução sobre cada secção de tecido e quando os cortes atingiram a cor desejada lavaram-se em água corrente. Após a lavagem imergiram-se as lâminas em hematoxilina (Hematoxylin 7211E, Richard-allan Scientific) durante 3 minutos e lavaram-se imediatamente em água corrente durante 10 minutos.

▪ DESIDRATAÇÃO DOS CORTES CORADOS E MONTAGEM DAS LÂMINAS

Desidrataram-se os cortes colocando as lâminas por cinco períodos de 1 minuto em etanol a 80, 80, 95 e 100% e xileno. De seguida retirou-se o excesso de xileno e adicionaram-se duas gotas de meio de montagem permanente (Entellan®, Merck (103602)) em cada lâmina. Cobriram-se os cortes com uma lamela de vidro, observaram-se ao microscópio óptico e fotografaram-se (sistema *Axio-observer Zeiss*).

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados obtidos foi efectuada com o programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia USA.

Os dados apresentados são a média \pm o desvio padrão de no mínimo 3 experiências independentes realizadas em triplicado. A análise estatística foi realizada pelo teste one-way ANOVA, utilizando os post-test Bonferroni ou Dunnett.

3. RESULTADOS

3.1. EFEITO DO 17 β -ESTRADIOL NA EXPRESSÃO DE GDNF EM CÉLULAS DE SUBSTANTIA NIGRA EM CULTURA

O efeito do 17 β -estradiol na expressão do GDNF em culturas mistas (neurónios e células da glia) de SN foi avaliado fazendo uma incubação de 48 horas com três concentrações diferentes de 17 β -estradiol (1 nM, 10 nM e 100 nM) seguida da determinação dos níveis de GDNF nos extractos celulares por Western-Blot.

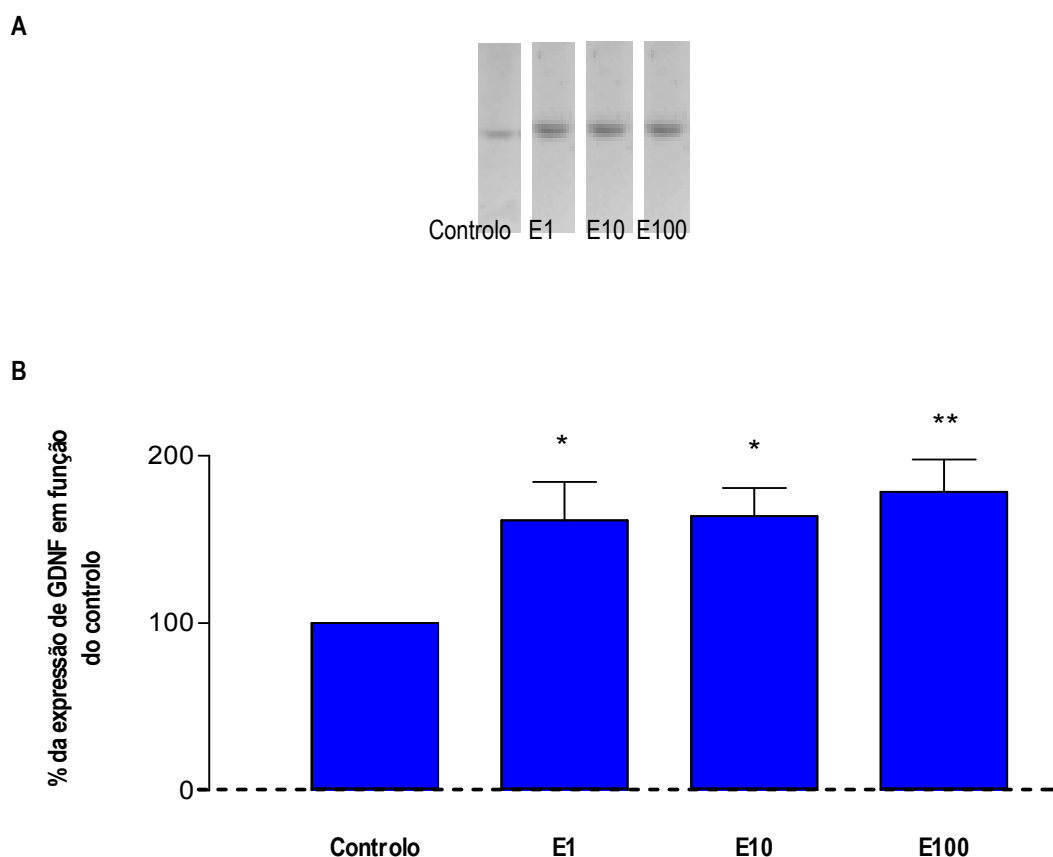


Figura 17: Efeito de diferentes concentrações de 17 β -estradiol na expressão de GDNF em culturas de SN. As culturas de SN foram incubadas com diferentes concentrações de 17 β -estradiol (E1= 1 nM, E10= 10 nM, E100= 100 nM) durante 48 horas e a expressão de GDNF celular foi determinada por Western-Blot. O painel A corresponde a uma imagem representativa das marcações obtidas nestas condições para as bandas correspondentes ao GDNF. O painel B apresenta os dados referentes à percentagem (média \pm erro padrão; n [6 a 9]) da expressão de GDNF relativamente a culturas não expostas a E₂ (controlo). *P <0,05 quando comparado com o controlo, **P <0,01 quando comparado com o controlo.

Os resultados obtidos mostraram que o 17 β -estradiol, em qualquer das concentrações utilizadas, aumenta significativamente os níveis de GDNF celular em culturas mistas de SN quando

comparados com culturas não tratadas. Não se observaram diferenças significativas entre as diferentes concentrações de 17β -estradiol utilizadas, o que poderá indicar que a concentração de 1 nM pode já ter um efeito máximo (figura 17).

O tratamento das culturas mistas de SN durante 48 horas com 1 nM, 10 nM e 100 nM de 17β -estradiol provocou um aumento de $61 \pm 8,7\%$ ($P < 0,05$), $64 \pm 6,6\%$ ($P < 0,05$) e $79 \pm 8,4\%$ ($P < 0,01$) dos níveis celulares de GDNF em relação ao controlo, respectivamente.

3.2. LOCALIZAÇÃO CELULAR DA EXPRESSÃO DE GDNF EM CÉLULAS DE SUBSTANTIA NIGRA EM CULTURA

Para se saber em que células (astrócitos e/ou neurónios) é expresso o GDNF nas culturas mistas de SN expostas ou não a 17β -estradiol procedemos a estudos de citometria de fluxo nas células incubadas durante 48 horas com 17β -estradiol 100 nM e em células controlo. Após as 48 horas do tratamento as culturas celulares foram incubadas com anticorpos primários anti-GFAP de forma a identificar astrócitos e com anti-GDNF.

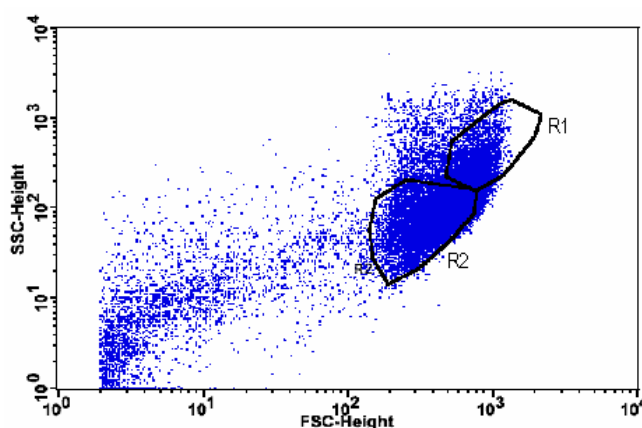


Figura 18: *Dot-plot forward scatter/ side scatter* da população de células de SN em cultura. As culturas de SN foram incubadas com 17β -estradiol 100 nM durante 48 horas e submetidas a imunocitoquímica para GFAP e GDNF. As duas populações celulares analisadas estão identificadas por R1 e R2, respectivamente.

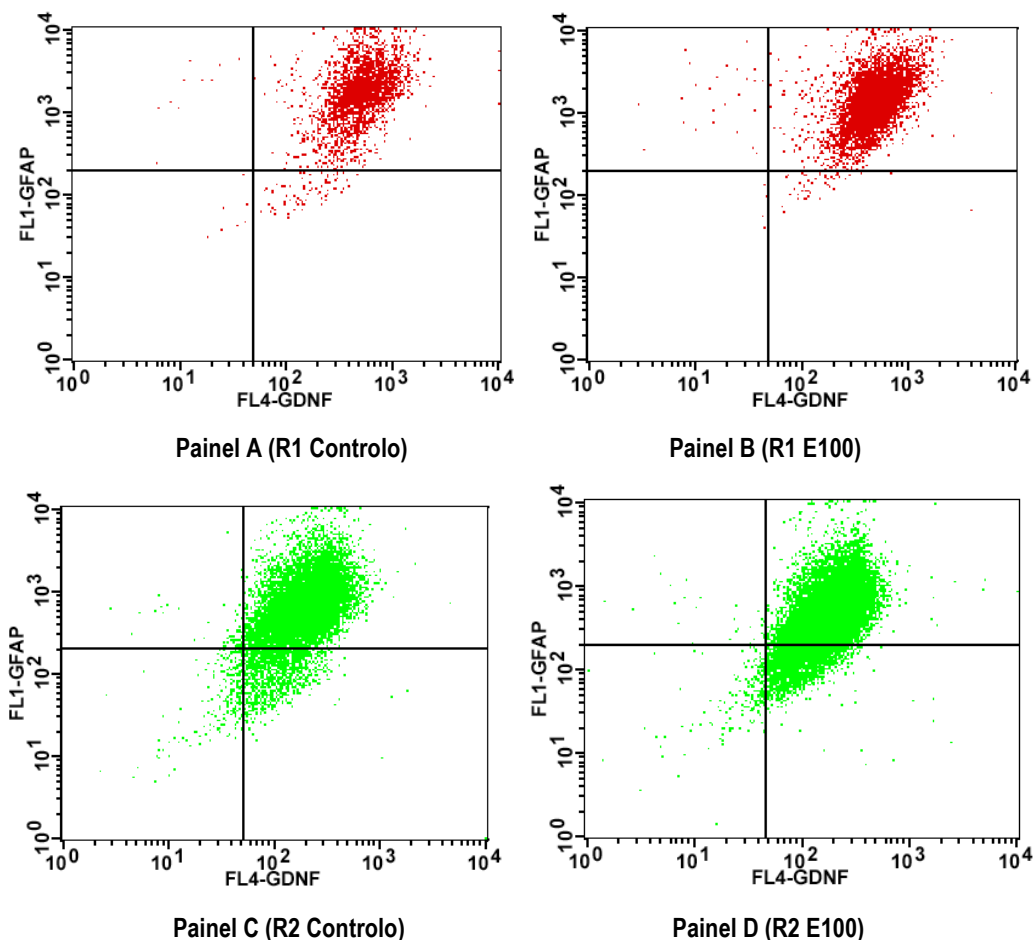


Figura 19: Dot-plot de fluorescência GFAP / fluorescência GDNF da população de células de SN em cultura. As culturas de SN foram incubadas com 17β -estradiol 100 nM durante 48 horas e submetidas a imunocitoquímica para GFAP e GDNF. Os painéis A e C apresentam as células controlo nas zonas R1 e R2, respectivamente; e os painéis B e D apresentam as células tratadas durante 48 horas com 17β -estradiol 100 nM (E100) nas zonas R1 e R2, respectivamente. Nos quadrantes superiores direitos encontram-se representadas as células marcadas simultaneamente para GFAP e GDNF.

Os resultados obtidos mostraram que o GDNF é expresso quer por células que marcam para GFAP quer por células GFAP negativas (figura 19). No entanto, quando comparámos a marcação para GDNF em células controlo e em células expostas a estradiol verificámos que os aumentos na expressão de GDNF se restringem a uma sub-população de astrócitos identificada no *dot-plot side scatter/forward scatter* com maior tamanho e complexidade (Figura 18). Esta sub-população é também a que apresenta níveis de marcação mais elevados. Nas culturas tratadas com 17β -estradiol verificou-se um aumento de 42,9% do número de células da sub-população positiva para GFAP (R1) marcadas simultaneamente para GFAP e GDNF, sugerindo que o estradiol

promove a expressão de GDNF numa sub-população de astrócitos na SN em cultura (painel B, figura 19).

3.3. CONTRIBUIÇÃO DE RECEPTORES DE ESTROGÉNIO PARA A EXPRESSÃO DE GDNF EM CÉLULAS DA *SUBSTANTIA NIGRA* EM CULTURA

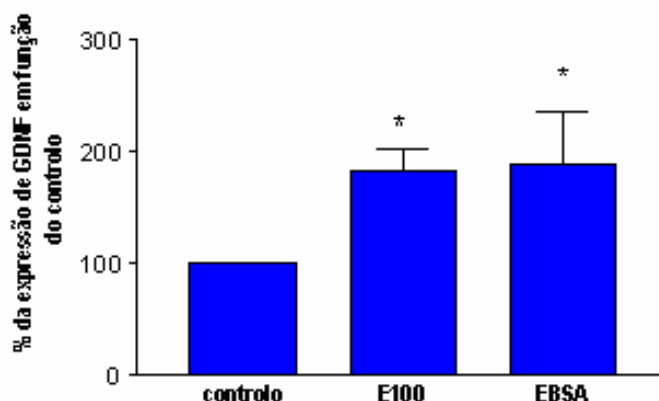


Figura 20: Efeito do 17 β -estradiol conjugado a BSA na expressão de GDNF em culturas de SN. As culturas de SN foram incubadas com 17 β -estradiol 100 nM (E100) ou 17 β -estradiol conjugado a BSA 10 nM (EBSA) durante 48 horas e a expressão de GDNF celular foi determinada por Western-Blot. Os dados apresentados referem-se à percentagem (média \pm erro padrão; n [4 a 9]) da expressão de GDNF celular em função de culturas não tratadas (controlo). *P < 0,05 quando comparado com o controlo.

Uma vez que a incubação com 17 β -estradiol foi relativamente longa (48 horas), os efeitos observados no aumento da expressão de GDNF em células de SN podem resultar de uma acção mediada por receptores intracelulares (acção genómica) ou de uma acção mediada por receptores membranares (não genómica).

Para determinarmos qual o mecanismo envolvido no efeito do 17 β -estradiol na expressão de GDNF recorreremos à utilização de uma forma não permeável às membranas celulares de 17 β -estradiol, o 17 β -estradiol conjugado a BSA (E:BSA). Para tal foi efectuada uma incubação de 48 horas com 17 β -estradiol 100 nM ou com E:BSA 10 nM. De seguida, determinaram-se os níveis de GDNF nos extractos celulares por Western-Blot.

Os resultados obtidos mostraram que a exposição a E:BSA 10 nM aumentou significativamente os níveis de GDNF celular em culturas mistas de SN quando comparados com culturas não tratadas. Por outro lado, não se verificaram diferenças significativas entre o efeito do

E:BSA e do 17β -estradiol (figura 20). O tratamento das culturas mistas de SN durante 48 horas com 17β -estradiol 100 nM e E:BSA 10 nM provocou um aumento de $81 \pm 9,4\%$ ($P < 0,05$) e $89 \pm 21,7\%$ ($P < 0,05$) dos níveis celulares de GDNF em relação ao controlo, respectivamente.

Outra abordagem para confirmar a acção de mecanismos genómicos ou não genómicos envolvidos na expressão de GDNF em células de SN tratadas com 17β -estradiol foi a utilização do antagonista de receptores de estrogénio intracelulares – ICI 182,780. Para tal as células foram incubadas durante 48 horas com 17β -estradiol 100 nM e/ou com ICI 182,780, 10 μ M, concentração esta que bloqueia de forma específica os RE intracelulares (Nakamizo et al., 2000; Platania et al., 2005; Ivanova et al., 2002). De seguida determinaram-se os níveis de GDNF nos extractos celulares por Western-Blot.

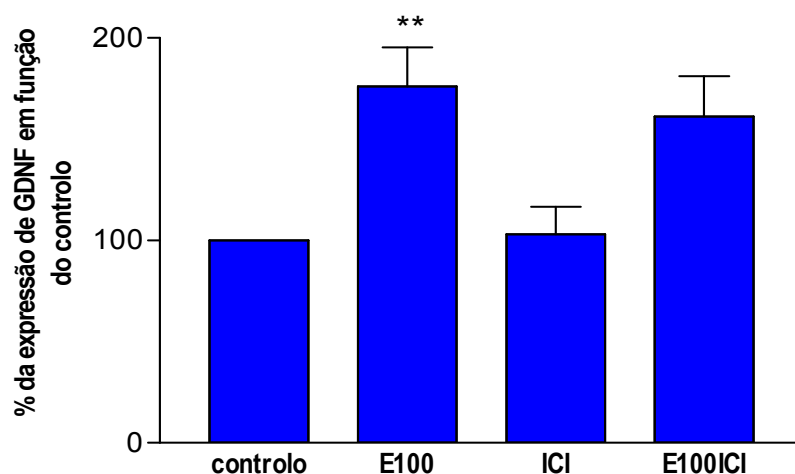


Figura 21: Efeito do ICI na expressão de GDNF em culturas de SN. As culturas de SN foram incubadas individualmente ou foram co-incubadas com 17β -estradiol 100 nM (E100) e ICI 182,780 10 μ M (ICI) durante 48 horas e a expressão de GDNF foi determinada por Western-Blot. Os dados apresentados referem-se à percentagem (média \pm erro padrão; n [3 a 10]) da expressão de GDNF relativamente a culturas não expostas a E_2 ou ICI (controlo). ** $P < 0,01$ quando comparado com o controlo.

Os resultados obtidos mostraram que o bloqueio dos RE intracelulares pelo ICI 182,720 das células da SN expostas a 17β -estradiol não afectou as alterações da expressão de GDNF induzidas pelo 17β -estradiol, e que a incubação unicamente com ICI também não alterou a expressão de GDNF observada em células controlo (figura 21). O tratamento das culturas mistas de SN durante 48 horas com 17β -estradiol 100nM ou com ICI 10 μ M provocou um aumento de $76 \pm 8,2\%$ ($P < 0,05$) e $61 \pm 7,2\%$ dos níveis de GDNF em relação ao controlo, respectivamente.

3.4. AUMENTO DA EXPRESSÃO DE GDNF EM CULTURAS DE *SUBSTANTIA NIGRA* POR ACÇÃO DO 17 β -ESTRADIOL: MODULAÇÃO POR EXPOSIÇÃO AOS AGENTES OXIDANTES L-DOPA E H₂O₂

A L-DOPA é o principal tratamento sintomático na DP mas está apontada nalguns estudos como indutora de neurotoxicidade devido à auto-oxidação (Pardo et al., 1995). Durante a metabolização da L-DOPA há formação de H₂O₂, OH, O₂⁻ e quinonas que, sendo estímulos oxidativos, aumentam os níveis de expressão do GDNF como mecanismo protector (Saavedra et al., 2006). Tal como observado nos ensaios anteriores, o 17 β -estradiol por si só promove um aumento da expressão de GDNF em células da SN. Nesta etapa do trabalho fomos estudar como é que os aumentos de GDNF promovidos pelo E₂ eram afectados pela exposição a agentes oxidantes como a L-DOPA, o principal tratamento sintomático da DP, e ao H₂O₂, um dos produtos da metabolização da L-DOPA.

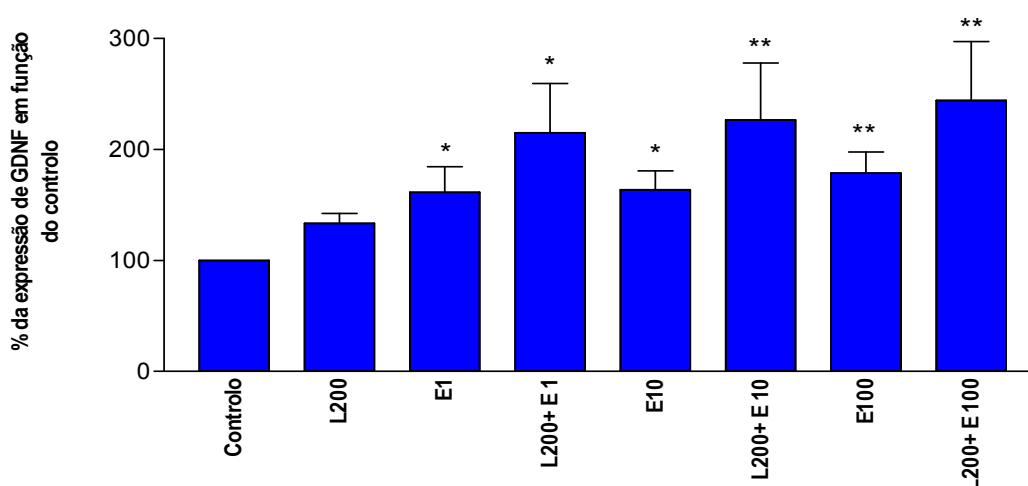


Figura 22: Acção da L-DOPA no efeito do 17 β -estradiol na expressão de GDNF em culturas de SN. As culturas foram incubadas com diferentes concentrações de 17 β -estradiol (E1= 1 nM, E10= 10 nM, E100= 100 nM) durante 24 horas seguidas da incubação com L-DOPA 200 μ M (L200) durante mais 24 horas. A expressão de GDNF foi determinada por Western-Blot. Os dados apresentados referem-se à percentagem (média \pm erro padrão; n [4 a 12]) da expressão de GDNF celular relativamente ao controlo (células não expostas a E₂). *P <0,05 quando comparado com o controlo, **P <0,01 quando comparado com o controlo.

Para determinarmos se a metabolização da L-DOPA altera a acção do 17β -estradiol na expressão de GDNF em células de SN, as culturas foram tratadas durante 24 horas com diferentes concentrações de 17β -estradiol (1 nM, 10 nM e 100 nM) seguindo-se uma incubação por mais 24 horas com 200 μ M de L-DOPA 200 μ M.

Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com L-DOPA 200 μ M de células pré-tratadas com diferentes concentrações de 17β -estradiol aumentou significativamente os níveis de GDNF quando comparados com o controlo. Apesar de existir uma tendência para que o tratamento com L-DOPA aumente a expressão do GDNF induzida pelo E_2 , essas diferenças não são estatisticamente significativas (figura 22).

O tratamento durante 24 horas com L-DOPA 200 μ M das culturas mistas de SN pré-tratadas anteriormente durante 24 horas com 17β -estradiol (1, 10 e 100 nM) provocou um aumento de $115\% \pm 24\%$ ($P < 0,05$), $127 \pm 29\%$ ($P < 0,01$) e $144 \pm 31\%$ ($P < 0,01$) dos níveis celulares de GDNF em relação ao controlo e de $54 \pm 11\%$, $63 \pm 14\%$ e $66 \pm 14\%$ dos níveis de GDNF em relação ao grupo pré-tratado com 17β -estradiol na concentração correspondente.

Fomos determinar ainda qual a acção que um dos produtos de metabolização da L-DOPA, o H_2O_2 , tinha na expressão do GDNF induzida pelo E_2 . As culturas foram tratadas durante 24 horas com diferentes concentrações de 17β -estradiol (1 nM, 10 nM e 100 nM) seguindo-se uma incubação por mais 24 horas com H_2O_2 50 μ M.

Os resultados obtidos mostraram que o H_2O_2 por si só aumentou significativamente os níveis de GDNF celular em culturas mistas de SN quando comparados com o controlo. Apesar de, tal como nos estudos com L-DOPA, existir de forma clara uma tendência para que o tratamento com H_2O_2 das culturas de SN pré-tratadas com as diferentes concentrações de 17β -estradiol aumente a expressão de GDNF em relação a culturas expostas apenas a 17β -estradiol ou culturas estimuladas apenas com H_2O_2 , essas diferenças foram estatisticamente significativas apenas para as células tratadas com 17β -estradiol 10 nM (figura 23).

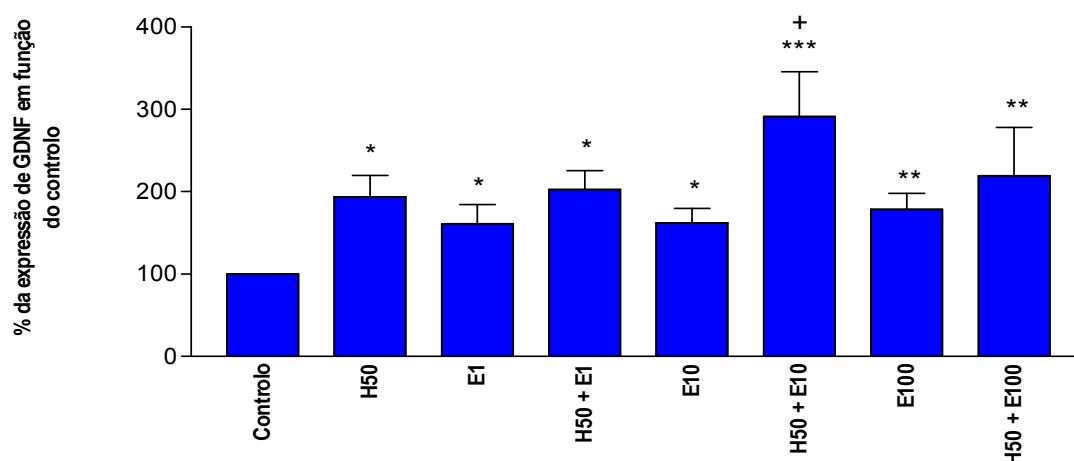


Figura 23: Acção do H_2O_2 na estimulação da expressão de GDNF induzida por 17β -estradiol em culturas de SN. As culturas foram incubadas com diferentes concentrações de 17β -estradiol (E1= 1 nM, E10= 10 nM, E100= 100 nM) durante 24 horas seguidas da incubação com H_2O_2 50 μ M (H50) durante mais 24 horas. A expressão de GDNF foi determinada por Western-Blot. Os dados apresentados referem-se à percentagem (média \pm erro padrão; n [3 a 11]) da expressão de GDNF celular em função de culturas não tratadas (controlo). *P <0,05 quando comparado com o controlo, **P <0,01 quando comparado com o controlo, ***P <0,001 quando comparado com o controlo, +P <0,05 quando comparado com E10.

Em células incubadas com 17β -estradiol (1 nM, 10 nM e 100 nM) a estimulação com H_2O_2 50 μ M induziu aumentos dos níveis de GDNF de $103 \pm 12\%$ (P <0,05), $191 \pm 36\%$ (P <0,001) e $119 \pm 32\%$ (P <0,01) respectivamente.

De forma a comparar a acção da L-DOPA e do metabolito da oxidação da L-DOPA envolvido no efeito do 17β -estradiol na expressão de GDNF em células da SN, comparámos a acção da L-DOPA e a acção do H_2O_2 no efeito do 17β -estradiol.

Os resultados obtidos mostraram não haver diferenças significativas entre a acção do H_2O_2 e a acção da L-DOPA no efeito do 17β -estradiol na expressão de GDNF celular em culturas mistas de SN (figura 24).

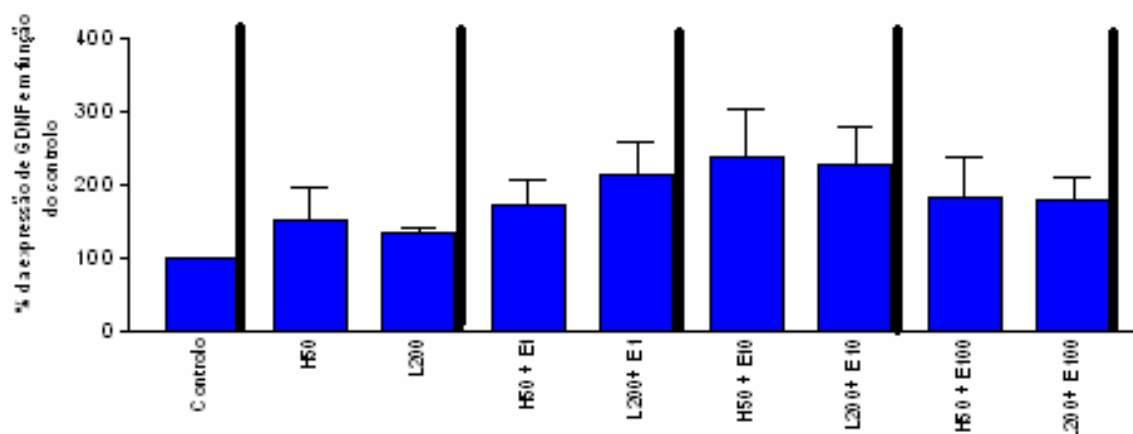


Figura 24: Comparação entre as acções da L-DOPA e do H₂O₂ no do efeito de diferentes concentrações de 17 β -estradiol na expressão de GDNF em culturas de SN. As culturas foram incubadas com diferentes concentrações de 17 β -estradiol (E1= 1 nM, E10= 10 nM, E100= 100 nM) durante 24 horas seguidas da incubação com H₂O₂ 50 μ M ou L-DOPA 200 μ M (L200) durante mais 24 horas, e a expressão de GDNF celular foi determinada por Western-Blot. Os dados apresentados referem-se à percentagem (média \pm erro padrão; n [3 a 12]) da expressão de GDNF celular em função de culturas não tratadas (controlo).

3.5. ESTUDOS *IN VIVO* DA ACÇÃO DO 17 β -ESTRADIOL NA VIA NIGROESTRIATAL

É conhecido o efeito neuroprotector do 17 β -estradiol ao nível do mesencéfalo, nomeadamente no sistema nigroestriatal, por reduzir os efeitos oxidantes. Uma forma de produzir danos oxidativos selectivos na SN é utilizar o modelo experimental de DP – a lesão local estriatal com 6-OHDA que após uma semana produz neurodegeneração retrógrada na SN. Para determinar se o 17 β -estradiol tem efeito protector na via nigroestriatal em modelos animais, administraram-se, a débito constante de 0,1 μ g/ml, 16 a 20 μ g de 17 β -estradiol a ratos Wistar machos durante 10 dias. Após 10 dias, foi induzida uma lesão unilateral por injeccção de 6-OHDA no estriado. No grupo controlo a solução de 17 β -estradiol foi substituída por veículo (propilenoglicol com 0,5% de etanol) e a injeccção foi efectuada também com veículo (solução salina de ácido ascórbico 0,2 mg/ml). Cinco dias após a injeccção, com 6-OHDA os animais foram sacrificados e os cérebros foram sujeitos a imunohistoquímica para TH na SN e no estriado e para GDNF na SN.

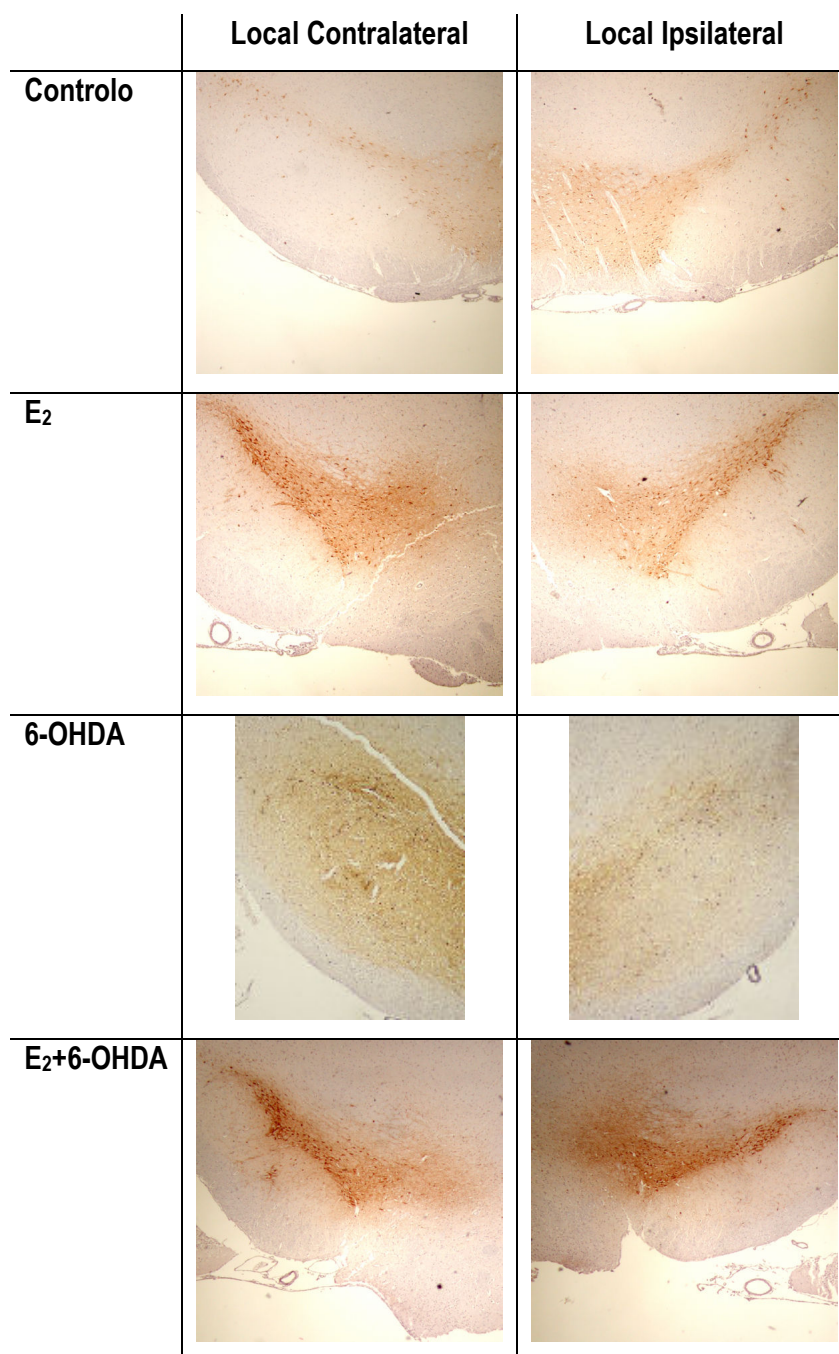


Figura 25: Imunohistoquímica para TH de cortes coronais da SN submetidos a tratamento com 17 β -estradiol e a posterior lesão unilateral com 6-OHDA. Ratos Wistar machos adultos foram implantados com cápsulas subcutâneas de libertação lenta com 17 β -estradiol (E₂) ou com veículo (Controlo) e após 10 dias foram injectados unilateralmente no estriado com 6-OHDA (6-OHDA) ou com veículo (Controlo). Após 5 dias efectuaram-se cortes coronais da SN e pesquisaram-se os neurónios dopaminérgicos através da marcação para TH. As imagens apresentadas referem-se aos lados ipsilateral e contralateral à lesão estriatal dos cortes coronais da SN de cada grupo (Controlo, E₂, 6-OHDA e E₂+6-OHDA, (n=3)) processados imunohistoquimicamente para TH (ampliadas 40x).

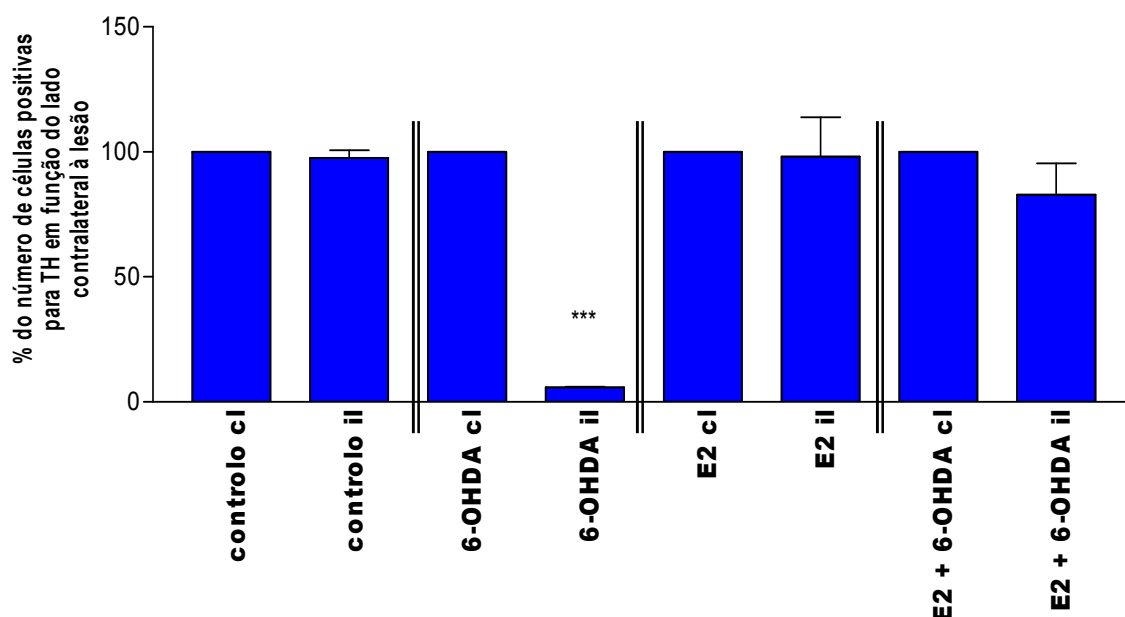


Figura 26: Contagem do número de células positivas para TH na SN referente à imunohistoquímica de cortes coronais submetidos a tratamento com 17 β -estradiol e a posterior lesão unilateral com 6-OHDA. Ratos Wistar machos adultos foram implantados com cápsulas subcutâneas de libertação lenta com 17 β -estradiol (E₂) ou com veículo (Controlo) e após 10 dias foram injectados unilateralmente no estriado com 6-OHDA (6-OHDA) ou com veículo (Controlo). Após 5 dias efectuaram-se cortes coronais da SN e do estriado e procedeu-se à contagem dos neurónios dopaminérgicos através da marcação para TH. A figura 26 representa o número de células positivas para TH na SN em cada grupo em função do lado contralateral à lesão. cl: contralateral à lesão, il: ipsilateral à lesão, ***P <0,001 quando comparado com o lado cl do mesmo grupo

Os resultados obtidos mostraram que o tratamento crónico dos animais com 17 β -estradiol reverteu a toxicidade induzida pela injeção de 6-OHDA e que a injeção e implante das soluções veículo não induziram alterações no número de células dopaminérgicas na SN (figuras 25 e 26).

A imagem correspondente ao grupo injectado com 6-OHDA e sem pré-tratamento com 17 β -estradiol mostra que o lado ipsilateral à lesão apresenta um reduzido número de células dopaminérgicas na SN quando comparado com o lado contralateral, o que demonstrou a eficácia da injeção com 6-OHDA em promover a degeneração dopaminérgica (figura 25). A injeção estriatal de 6-OHDA reduziu $94 \pm 3\%$ (P <0,001) o número de células positivas para TH na SN em relação ao lado contralateral à lesão (figura 26). As imagens referentes ao grupo pré-tratado com 17 β -estradiol e posteriormente lesado com 6-OHDA mostraram que o número de células dopaminérgicas na SN do lado ipsilateral à lesão é muito superior ao do grupo sem pré-tratamento com E₂ e não apresenta diferenças em relação ao lado contralateral, o que indica que o tratamento com E₂ impediu a neurodegeneração das células dopaminérgicas da SN por exposição à 6-OHDA (figura 25). O pré-

tratamento com 17β -estradiol reverteu $77 \pm 12\%$ a morte de células positivas para TH induzida pela 6-OHDA (figura 26).

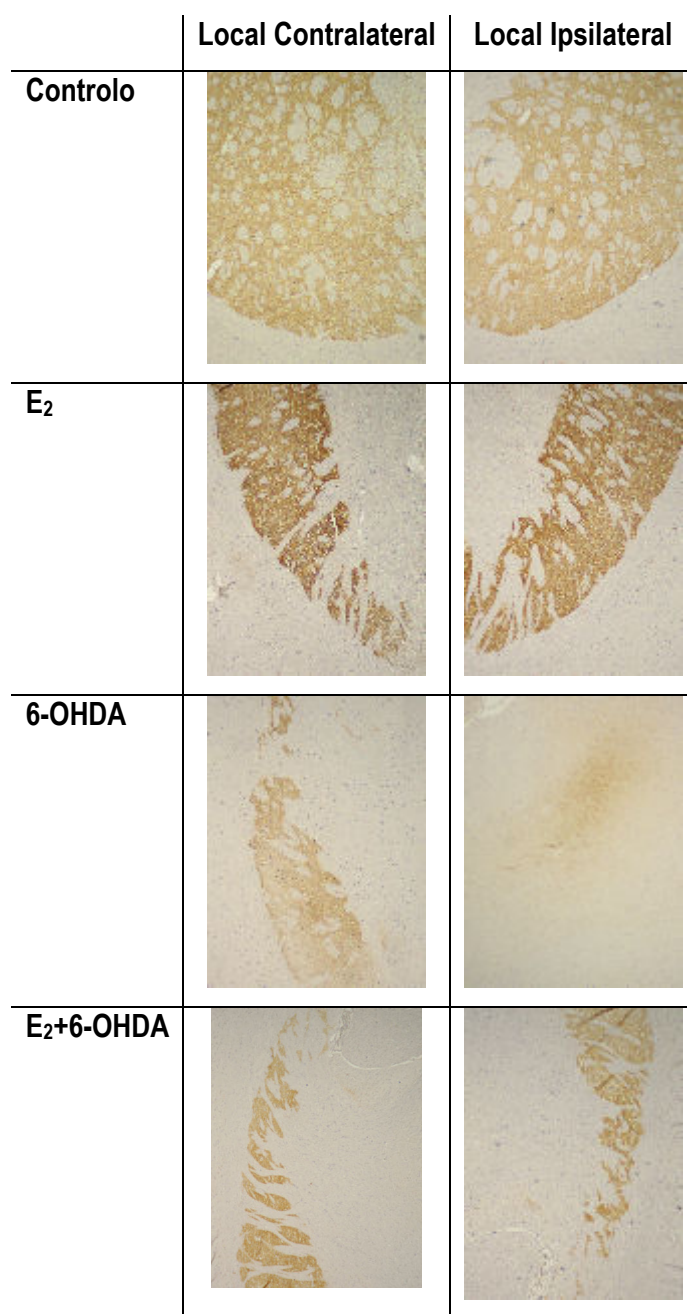


Figura 27: Imunohistoquímica para TH de cortes coronais do estriado de animais submetidos a tratamento com 17β -estradiol e a posterior lesão unilateral com 6-OHDA. Ratos Wistar machos adultos foram implantados com cápsulas subcutâneas de libertação lenta com 17β -estradiol (E₂) ou com veículo (Controlo) e após 10 dias foram injectados unilateralmente no estriado com 6-OHDA (6-OHDA) ou com veículo (Controlo). Após 5 dias efectuaram-se cortes coronais do estriado e pesquisaram-se os neurónios dopaminérgicos através da TH. As imagens apresentadas referem-se aos lados ipsilateral e contralateral à lesão estriatal dos cortes coronais do estriado de cada grupo (Controlo, E₂, 6-OHDA e E₂+6-OHDA, (n=3)) processados imunohistoquimicamente para TH (ampliadas 40x).

Com o intuito de verificar se os resultados obtidos na SN se observam ao longo da via nigroestriatal, fomos visualizar os efeitos nas projecções dos neurónios da SN ao nível do estriado. Verificamos que o estriado reflectiu o que acontece na SN, ou seja, quando há redução do número de células dopaminérgicas na SN também há redução do número de projecções dopaminérgicas no estriado. Desta forma observámos que o tratamento crónico dos animais com 17β -estradiol reverteu a toxicidade induzida pela injeção de 6-OHDA na via nigroestriatal (figura 27).

A imagem correspondente ao grupo injectado com 6-OHDA sem pré-tratamento com 17β -estradiol mostra que o lado ipsilateral à lesão apresenta um reduzido número de projecções dopaminérgicas no estriado quando comparado com o lado contralateral ou com o controlo. As imagens referentes ao grupo pré-tratado com 17β -estradiol e posteriormente lesado com 6-OHDA mostram que o número de projecções dopaminérgicas no estriado do lado ipsilateral à lesão é muito superior ao do grupo sem pré-tratamento com E_2 e não apresenta diferenças em relação ao lado contralateral. Estes resultados indicam que o tratamento com E_2 impediu a neurodegeneração da via nigroestriatal dopaminérgica por exposição à 6-OHDA (figura 27).

No intuito de perceber se o tratamento dos animais com 17β -estradiol promovia aumentos da expressão de GDNF na SN, à semelhança do observado dos estudos *in vitro*, procedemos à imunohistoquímica para GDNF de cortes coronais da SN de animais do grupo controlo e de animais do grupo tratado com 17β -estradiol.

Os resultados obtidos sugerem que o tratamento crónico dos animais com 17β -estradiol parece aumentar a intensidade da marcação do GDNF nas células da SN (figura 28).

As imagens de maior ampliação mostram que as células marcadas para GDNF do grupo E_2 se apresentam coradas mais intensamente que as do grupo controlo, sugerindo que a exposição dos animais ao 17β estradiol promoveu um aumento da expressão do GDNF na SN (figura 28).

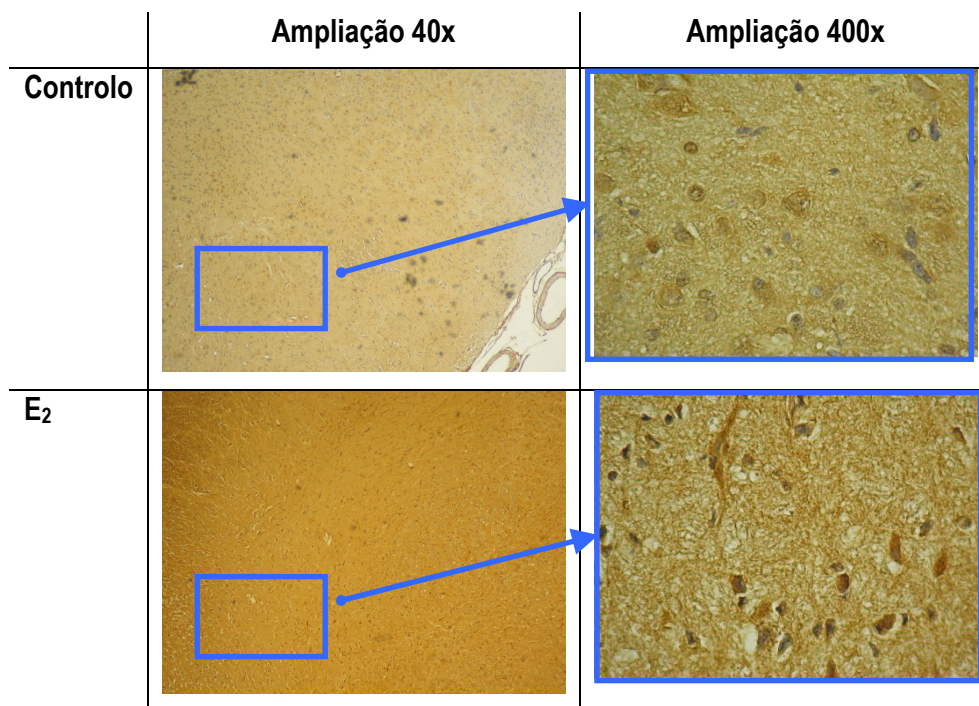


Figura 28: Imunohistoquímica para GDNF de cortes coronais da SN de animais submetidos a tratamento com 17 β -estradiol. Ratos Wistar machos adultos foram implantados com cápsulas subcutâneas de libertação lenta com 17 β -estradiol (E₂) ou com veículo (Controlo) e após 10 dias foram injectados unilateralmente no estriado com veículo (Controlo). Após 5 dias efectuaram-se cortes coronais da SN e pesquisaram-se células positivas para GDNF. As imagens apresentadas referem-se aos cortes coronais da SN do grupo Controlo e do grupo E₂ (n=3) processados imunohistoquimicamente para GDNF. As imagens da esquerda estão ampliadas 40x e as da direita correspondem a zonas mais ampliadas das imagens da esquerda (ampliação 400x)

4. DISCUSSÃO

Com este estudo pretendemos perceber de que forma o estradiol interfere na expressão do GDNF na SN e qual o contributo dessa acção na neuroprotecção da via nigroestriatal.

Aumentos dos níveis de GDNF pelo estradiol *in vitro*

Os dados obtidos demonstraram que a exposição de culturas de SN ao 17 β -estradiol (1 a 100 nM) durante 48 horas aumentou significativamente os níveis de GDNF (figura 17). Em trabalhos anteriores já se tinha verificado a relação entre a exposição de culturas celulares de outras zonas do sistema nervoso ao 17 β -estradiol e o aumento da expressão de GDNF. Esse aumento observou-se em astrócitos de medula espinhal pós-natal (Platania et al., 2005) e em neurónios do hipotálamo neonatal (Ivanova et al., 2002). Nem só o aumento da expressão de GDNF está associado ao estradiol. A exposição de culturas celulares ao 17 β -estradiol também aumenta os níveis de outros factores neurotróficos. Estudos efectuados desde 1990 revelaram que os estrogénios regulam a expressão de neurotrofinas em várias zona cerebrais. A relação existente entre a acção do estradiol e o BDNF foi observada em vários trabalhos. Em fetos e recém-nascidos de ratos e em células fetais mesencefálicas em cultura, o estradiol estimula a diferenciação dos neurónios dopaminérgicos através da expressão do BDNF (Ivanova et al., 2001). O estradiol também promove a expressão de BDNF em neurónios do hipocampo (Murphy et al., 1998). Apesar de ser claro que o estradiol promove a expressão de GDNF e de BDNF, trabalhos efectuados em mesencéfalo embrionário em cultura indicaram que esse efeito não se verifica com outras neurotrofinas como o NGF, o NT3 e o NT4/5 (Ivanova et al., 2001).

Expressão do GDNF pelos astrócitos

Os resultados apresentados na figura 19 indicam que, em células da SN em cultura, o GDNF é expresso maioritariamente pelos astrócitos. Verificámos que as células da SN em cultura que expressam GFAP, uma proteína presente apenas em astrócitos (Reeves et al., 1989), são as mesmas que expressam GDNF. Este facto ocorreu em células não tratadas com 17 β -estradiol e de

forma mais acentuada em células tratadas, verificando-se um aumento do número de células GFAP positivas a expressarem GDNF após 48 horas de incubação com 17β -estradiol. O aumento da expressão de GDNF induzido pelo estradiol não foi resultado da síntese do factor neurotrófico noutra população celular, como por exemplo neurónios, mas sim uma intensificação do número de astrócitos a expressarem GDNF. Os resultados sugerem ainda que existe uma sub-população de astrócitos a responderem ao estímulo exercido pelo estradiol na expressão de GDNF e não todos os astrócitos da SN em cultura (painel B, figura 19). Estudos anteriormente realizados em co-culturas de astrócitos de medula espinhal e neurónios motores de rato (Platania et al., 2005), em células de SN de rato em cultura (Saavedra et al., 2005) e em células C6 de glioblastoma e astrócitos de córtex de rato recém-nascido (Yu et al., 1998), também demonstraram a expressão de GDNF em astrócitos. No entanto, em células embrionárias do hipotálamo de rato (Ivanova et al., 2002) o GDNF parece ser expresso por neurónios e não por astrócitos. Platania et al. (2005) e Ivanova et al. (2001) obtiveram resultados semelhantes aos apresentados no presente trabalho, nomeadamente o aumento da expressão do GDNF apenas em astrócitos após exposição a estradiol de culturas de diferentes populações celulares (medula espinhal e mesencéfalo).

No que respeita a outros factores neurotróficos, estudos efectuados em células de mesencéfalo neonatal em cultura indicaram que apenas os neurónios, principalmente os não dopaminérgicos, aumentam a expressão do BDNF em resposta ao estradiol (Ivanova et al., 2001).

Expressão de GDNF por acção de RE α

A utilização de E:BSA e ICI 162,780 indicou que a forma não permeável do estradiol tem o mesmo efeito que o estradiol livre e que o bloqueio dos RE intracelulares não impediu o efeito do estradiol na expressão do GDNF na SN em cultura (figuras 20 e 21). Estes resultados sugerem que a acção do estradiol na expressão de GDNF em células em cultura de SN não é mediada por receptores intracelulares e acções genómicas, mas que o estradiol actua via receptores membranares. Os resultados obtidos estão de acordo com outros estudos efectuados em células embrionárias de hipotálamo em cultura, onde o estradiol induziu a expressão de GDNF através de um mecanismo não genómico (Ivanova et al., 2002). Por outro lado, em co-culturas de astrócitos de medula espinhal e neurónios motores o estradiol promove a expressão de GDNF provavelmente via ER α membranares existentes nos astrócitos (Platania et al., 2005). Também os estudos efectuados

por Pawlak et al. (2005) indicam que no mesencéfalo o estradiol interage com o RE α membranar dos astrócitos, promovendo a síntese de GDNF nesta população celular. Apenas alguns astrócitos do mesencéfalo expressavam RE membranares e, por isso, só esses respondem ao estímulo exercido pelo estradiol na expressão do GDNF (Beyer et al., 2003). Os resultados por nós obtidos sugeriram que o mesmo fenómeno ocorre nas culturas de SN utilizadas no presente trabalho. Por conseguinte, o mecanismo através do qual o estradiol promove a expressão de GDNF na SN parece idêntico ao anteriormente proposto por Beyer et al. (2003).

No que respeita a outros factores neurotróficos, em fetos e recém-nascidos de rato e em células fetais mesencefálicas a expressão do BDNF induzida pelo estradiol é mediada por receptores de estrogénio membranares (Ivanova et al., 2001).

Aumentos da expressão de GDNF por acção de L-DOPA, H₂O₂ e estradiol

O stress oxidativo induz a expressão de GDNF e que este aumento pode proteger as células de danos oxidativos (Saavedra et al., 2006). A L-DOPA é o principal tratamento sintomático na DP, mas alguns estudos revelaram efeitos neurotóxicos devido à auto-oxidação (Pardo et al., 1995). Nessa metabolização há formação de ROS incluindo o H₂O₂, que promove a expressão de GDNF em células pós-natais de SN em cultura (Saavedra et al., 2006). Nos ensaios por nós efectuados, não observámos diferenças significativas em relação ao estímulo de 24 horas com L-DOPA, onde verificámos que por si só a L-DOPA, nas concentrações utilizadas, não alterou significativamente a expressão de GDNF. Porém observou-se uma tendência para um aumento da expressão de GDNF em células pré-tratadas com 17 β -estradiol antes de serem expostas a L-DOPA comparativamente aos efeitos registados em células incubadas unicamente com 17 β -estradiol ou unicamente com L-DOPA (figura 22).

A exposição de células da SN a H₂O₂ aumenta a expressão de GDNF (Saavedra et al., 2006). Estes resultados estão de acordo com os por nós obtidos, que indicam um aumento da expressão do GDNF por H₂O₂ nas células de SN. Verificámos ainda que em células pré-tratadas 24 horas com 17 β -estradiol há uma tendência para que a expressão de GDNF aumente substancialmente relativamente aos efeitos observados em células incubadas unicamente com 17 β -estradiol ou unicamente com H₂O₂. Esse aumento foi claramente significativo no caso dos estudos com estradiol 10 nM (figura 23).

Os efeitos dos agentes oxidantes estudados sugerem que os mecanismos pelos quais os astrócitos da SN em cultura aumentam a expressão do GDNF em resposta à L-DOPA ou H_2O_2 e em resposta ao estradiol são diferentes, sendo por isso os níveis de GDNF obtidos com qualquer um dos estímulos independentes inferiores aos níveis obtidos com coexposições de estradiol e agentes oxidantes.

No que respeita ao estradiol, o cálcio intracelular e a sinalização cAMP/PKA são essenciais para a indução da expressão de GDNF nas células do hipotálamo exercida pelo estradiol. Ambas as vias convergem para a transcrição do factor CREB (Nichols et al., 1992) o que sugere que a região promotora do GDNF tenha locais de ligação ao CREB (Woodbury et al., 1998; Baecker et al., 1999). Ensaios em que se testou a regulação do GDNF pelo estradiol em culturas de astrócitos e de neurónios mesencefálicos de embrião mostraram que a sinalização pelo cálcio intracelular e pela MAPK é essencial para esta acção do estradiol (revisto por Kipp et al., 2006).

Estudos anteriores revelaram que a acção do H_2O_2 no aumento da expressão do GDNF parece envolver o factor de transcrição NF- κ B. O H_2O_2 activa a transcrição do factor NF- κ B (Meyer et al., 1993) e a indução da expressão do GDNF pelo H_2O_2 é revertida na presença de inibidores da activação do NF- κ B em astrócitos em cultura (Koyama et al., 2003). Estas observações sugerem que o aumento dos níveis RNAm do GDNF e da proteína observados na presença de H_2O_2 envolvam o NF- κ B.

A acção da L-DOPA na expressão do GDNF por células da SN em cultura pode ser causada tanto por agentes oxidantes resultantes da metabolização da dopamina, como pela própria dopamina. No caso dos agentes oxidantes, o mecanismo proposto inclui o NF- κ B como sinalizador o NF- κ B. A acção da dopamina na expressão do GDNF engloba a activação de receptores de dopamina D1 e D2 e o aumento simultâneo da expressão de FGF-2 e GDNF em astrócitos estriatais (Li et al., 2006). De facto, o FGF já tinha sido anteriormente sugerido como promotor da expressão e libertação de GDNF em células C6 (Suter-Crazzola et al., 1996; Verity et al., 1998). Em 1998, Grim et al. demonstraram que o FGF-2 interfere na actividade promotora do gene GDNF e, posteriormente, foi observado que o FGF-2 estimula a expressão do GDNF e de GFR α 1 em neurónios de hipocampo (Lenhard et al., 2002). O mecanismo de acção do FGF-2 sobre a expressão do GDNF inclui a activação de uma CREB cinase (Tan et al., 1996; Woodbury et al., 1998; Baecker et al., 1999). Por conseguinte, as vias de sinalização utilizadas pelo FGF-2 e pelo estradiol parecem convergentes.

A neuroprotecção exercida pelo estradiol *in vivo*

A neuroprotecção exercida pelo estradiol na SN está documentada há alguns anos tanto em estudos *in vitro* (Biewenga et al., 2005) como em estudos *in vivo* (Callier et al., 2000). Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o tratamento crónico dos animais com 17 β -estradiol reverteu a toxicidade induzida pela injeção de 6-OHDA nos neurónios dopaminérgicos, apoiando o efeito neuroprotector do estradiol em células dopaminérgicas na SN *in vivo* (figuras 25, 26 e 27).

O grupo pré-tratado com 17 β -estradiol e posteriormente lesado com 6-OHDA revelou que o número de células dopaminérgicas na SN do lado ipsilateral à lesão era semelhante ao do lado contralateral. Esta observação indica que o tratamento crónico com E₂ impediu a neurodegeneração das células dopaminérgicas da SN por lesão estriatal com 6-OHDA. A acção de neuroprotecção exercida pelo estradiol nos neurónios da SN quando lesados com 6-OHDA foi claramente demonstrada no nosso estudo. O estradiol impediu que a toxina provocasse a morte dos neurónios dopaminérgicos como acontece em animais não expostos a estradiol (figuras 25 e 26). No que respeita aos resultados obtidos no estriado, estes reflectem o que se observa na SN (figura 27).

Estas observações vêm confirmar a neuroprotecção exercida pelo estradiol na via nigroestriatal. Este facto faz-nos afirmar que as fêmeas em idade reprodutiva têm uma maior capacidade de manutenção e neuroprotecção das células dopaminérgicas nigroestriatais contra o stress oxidativo, o que indirectamente significa estarem mais protegidas para o desenvolvimento da DP. As nossas conclusões vão de encontro às sugeridas por outros autores que afirmam estar a neuroprotecção pelo estradiol na SN *in vivo* (Callier et al., 2000) associada à protecção contra o stress oxidativo (Sawada et al., 1998), especificamente na toxicidade induzida por 6-OHDA (revisto por Dluzen., 2000). Nesses estudos, tal como no nosso, o efeito protector nas células dopaminérgicas nigroestriatais *in vivo* do estradiol é conseguido com concentrações de estradiol correspondentes às concentrações fisiológicas normais de fêmeas em idade reprodutiva.

Ensaios de imunohistoquímica em cérebros humanos mostraram que o GDNF se expressa em vários locais do cérebro nomeadamente no hipocampo, mais intensamente em fases neonatais (Serra et al., 2002), e na SN (Del Fiacco et al., 2002). No nosso estudo detectámos GDNF na SN (figura 28), tanto em situações controlo como em animais sujeitos a exposição crónica com 17 β -estradiol. Assim como nos estudos *in vitro*, os resultados *in vivo* sugerem que o estradiol promove a elevação dos níveis de GDNF na SN.

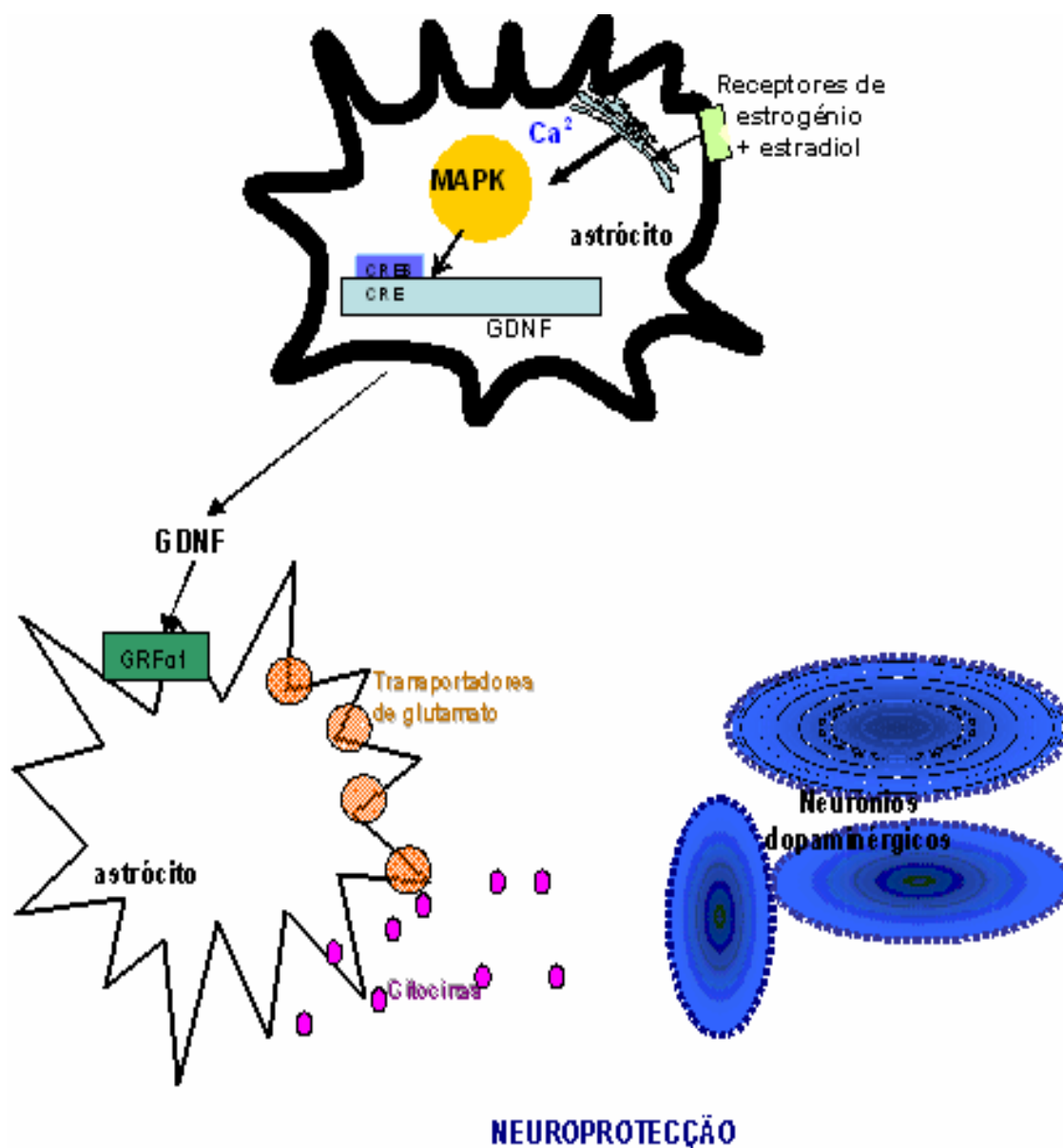


Figura 29: Mecanismo da regulação dos níveis de GDNF na SN pelo estradiol e sua contribuição na neuroprotecção. Representação esquemática da hipótese explicativa da acção do estradiol na SN, baseada nos resultados do presente trabalho e em trabalhos efectuados por outros autores. O estradiol liga-se aos RE α membranares de uma sub-população de astrócitos o que leva ao aumento dos níveis de cálcio intracelular (revisto por Kipp et al., 2006). Este aumento vai activar a via das MAPK (revisto por Kipp et al., 2006) e promover a ligação de CREB ao DNA na região promotora do gene do GDNF e consequente transcrição (Nichols et al., 1992; Woodbury et al., 1998; Baecker et al., 1999). O aumento dos níveis de RNAm do GDNF causa a elevação dos níveis da proteína e a sua libertação para o meio extracelular. Nesta fase o GDNF liga-se ao receptor GRF α 1 existente nas membranas de astrócitos, estimulando a produção de transportadores de glutamato e também a expressão e libertação de citocinas. Os transportadores de glutamato facilitam a recaptura deste neurotransmissor e reduzem a excitotoxicidade. As citocinas podem também exercer, em determinadas situações uma acção protectora nas células envolvidas nomeadamente nos neurónios dopaminérgicos (revisto por Kipp et al., 2006).

Tendo em conta que nos estudos *in vivo* verificámos a existência de neuroprotecção exercida pelo estradiol na via nigroestriatal e que o estradiol aumentou a expressão de GDNF tanto *in vitro* como *in vivo*, é plausível sugerir que o estradiol exerce a sua acção protectora através do aumento da expressão de GDNF e por controlo dos níveis de stress oxidativo.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o estradiol tem a capacidade de proteger a via nigroestriatal de lesões oxidativas nomeadamente por aumento da expressão do GDNF na SN, o que atenua a morte dos neurónios dopaminérgicos em situações de stress oxidativo.

A análise dos resultados permite-nos propor um mecanismo de acção da neuroprotecção exercida pelo estradiol por intermédio do GDNF na SN (figura 29).

5. CONCLUSÕES

Os estudos realizados em culturas mistas de astrócitos e de neurónios da SN, preparadas a partir de ratos Wistar com idades entre 1 a 3 dias, e em ratos Wistar adultos machos permitiram concluir que:

Em células pós-natais de SN em cultura, o 17β -estradiol promove o acréscimo da expressão do GDNF por parte dos astrócitos. Este efeito é exercido através da ligação do estradiol a RE membranares e é potenciado por L-DOPA e H_2O_2 .

In vivo, o estradiol protege as células dopaminérgicas da SN da lesão causada por 6-OHDA, através da estimulação da síntese de GDNF.

Os resultados obtidos sugerem que a eficácia do tratamento com L-DOPA nas mulheres em idade reprodutiva poderá estar eventualmente relacionada com uma maior expressão do GDNF nestas mulheres, em que os níveis de estradiol são mais elevados. Caso esta hipótese se venha a confirmar, a utilização de princípios activos capazes de activarem os mecanismos pelos quais o estrogénio aumenta a produção de GDNF será benéfica no tratamento de DP.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Para demonstrar de forma inequívoca o envolvimento do GDNF na neuroprotecção é necessário realizar ensaios que demonstrem a diminuição da neuroprotecção exercida pelo estradiol quando os níveis de GDNF permanecem inalterados.

Seria também relevante estabelecer uma correlação entre a expressão de GDNF e a protecção das células dopaminérgicas *in vivo* com recurso a métodos de análise quantitativa.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahlskog JE. 2005. Challenging conventional wisdom: the etiologic role of dopamine oxidative stress in Parkinson's disease. *Mov Disord* 20:271-282.

Airaksinen MS, Saarma M. 2002. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci* 3:383-394.

Ambani LM, Van Woert MH, Murphy S. 1975. Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Arch Neurol* 32:114-118.

Andersen JK. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl:S18-25.

Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibanez CF. 1995. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron* 15:1465-1473.

Asanuma M, Miyazaki I, Ogawa N. 2003. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: the role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox Res* 5:165-176.

Ba F, Pang PK, Davidge ST, Benishin CG. 2004. The neuroprotective effects of estrogen in SK-N-SH neuroblastoma cell cultures. *Neurochem Int* 44:401-411.

Behl C, Moosmann B, Manthey D, Heck S. 2000. The female sex hormone oestrogen as neuroprotectant: activities at various levels. *Novartis Found* 230:221-34

Behl C, Skutella T, Lezoualc'h F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. 1997. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol Pharmacol* 51:535-541.

Beyer C, Karolczak M. 2000. Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase A signalling. *J Neurosci Res* 59:107-116.

Beyer C, Pawlak J, Brito V, Karolczak M, Ivanova T, Kuppers E. 2003. Regulation of gene expression in the developing midbrain by estrogen: implication of classical and nonclassical steroid signaling. *Ann N Y Acad Sci* 1007:17-28.

Bennett DL, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, McMahon SB, Priestley JV. 1998. A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci* 18:3059-3072.

Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. 2000. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3:1301-1306.

- Biewenga E, Cabell L, Audesirk T. 2005. Estradiol and raloxifene protect cultured SN4741 neurons against oxidative stress. *Neurosci Lett* 373:179-183.
- Blurton-Jones M, Kuan PN, Tuszynski MH. 2004. Anatomical evidence for transsynaptic influences of estrogen on brain-derived neurotrophic factor expression. *J Comp Neurol* 468:347-360.
- Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA. 2004. Molecular pathways to neurodegeneration. *Nat Med* 10 Suppl:S2-9.
- Bower JH, Maraganore DM, Peterson BJ, McDonnell SK, Ahlskog JE, Rocca WA. 2003. Head trauma preceding PD: a case-control study. *Neurology* 60:1610-1615.
- Buckman TD, Sutphin MS, Mitrovic B. 1993. Oxidative stress in a clonal cell line of neuronal origin: effects of antioxidant enzyme modulation. *J Neurochem* 60:2046-2058.
- Burns MP, Duff K. 2004. Brain on steroids resists neurodegeneration. *Nat Med* 10:675-676.
- Cacalano G, Farinas I, Wang LC, Hagler K, Forgie A, Moore M, Armanini M, Phillips H, Ryan AM, Reichardt LF, Hynes M, Davies A, Rosenthal A. 1998. GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron* 21:53-62.
- Callier S, Morissette M, Grandbois M, Di Paolo T. 2000. Stereospecific prevention by 17beta-estradiol of MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Synapse* 37:245-251.
- Catt KJ. 1970. IV Reproductive endocrinology. *Lancet* 1:1097-1104.
- Chang YP, Fang KM, Lee TI, Tzeng SF. 2006. Regulation of microglial activities by glial cell line derived neurotrophic factor. *J Cell Biochem* 97:501-511.
- Cohen G, Heikkila RE. 1974. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 249:2447-2452.
- Chauhan NB, Siegel GJ, Lee JM. 2001. Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. *J Chem Neuroanat* 21:277-288.
- Choi-Lundberg DL, Bohn MC. 1995. Ontogeny and distribution of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in rat. *Brain Res Dev Brain Res* 85:80-88.
- Cohen G. 1984. Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 5:77-82.
- Corrigan FM, Wienburg CL, Shore RF, Daniel SE, Mann D. 2000. Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J Toxicol Environ Health A* 59:229-234.
- Cotman CW, Berchtold NC. 2002. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25:295-301.
- Cyr M, Calon F, Morissette M, Di Paolo T. 2002. Estrogenic modulation of brain activity: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *J Psychiatry Neurosci* 27:12-27.

Dauer W, Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.

Del Fiacco M, Quartu M, Serra MP, Follesa P, Lai ML, Bachis A. 2002. Topographical localization of glial cell line-derived neurotrophic factor in the human brain stem: an immunohistochemical study of prenatal, neonatal and adult brains. *J Chem Neuroanat* 23:29-48.

Dhandapani KM, Brann DW. 2002. Protective effects of estrogen and selective estrogen receptor modulators in the brain. *Biol Reprod* 67:1379-1385.

di Michele F, Longone P, Romeo E, Lucchetti S, Brusa L, Pierantozzi M, Bassi A, Bernardi G, Ding YM, Jaumotte JD, Signore AP, Zigmond MJ. 2004. Effects of 6-hydroxydopamine on primary cultures of substantia nigra: specific damage to dopamine neurons and the impact of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 89:776-787.

Ding YM, Jaumotte JD, Signore AP, Zigmond MJ. 2004. Effects of 6-hydroxydopamine on primary cultures of substantia nigra: specific damage to dopamine neurons and the impact of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 89:776-787.

Dluzen DE. 2000. Neuroprotective effects of estrogen upon the nigrostriatal dopaminergic system. *J Neurocytol* 29:387-399.

Du F, Li R, Huang Y, Li X, Le W. 2005. Dopamine D3 receptor-preferring agonists induce neurotrophic effects on mesencephalic dopamine neurons. *Eur J Neurosci* 22:2422-2430.

Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. 1999. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J Neurosci* 19:6385-6393.

Enokido Y, Wyatt S, Davies AM. 1999. Developmental changes in the response of trigeminal neurons to neurotrophins: influence of birthdate and the ganglion environment. *Development* 126:4365-4373.

Eslamboli A, Georgievska B, Ridley RM, Baker HF, Muzyczka N, Burger C, Mandel RJ, Annett L, Kirik D. 2005. Continuous low-level glial cell line-derived neurotrophic factor delivery using recombinant adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 25:769-777.

Evans RM. 1998. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895.

File SE, Hartley DE, Alom N, Rattray M. 2003. Soya phytoestrogens change cortical and hippocampal expression of BDNF mRNA in male rats. *Neurosci Lett* 338:135-138.

Gao X, Dluzen DE. 2001. Tamoxifen abolishes estrogen's neuroprotective effect upon methamphetamine neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system. *Neuroscience* 103:385-394.

Garcia-Martinez JM, Perez-Navarro E, Gavalda N, Alberch J. 2006. Glial cell line-derived neurotrophic factor promotes the arborization of cultured striatal neurons through the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci Res* 83:68-79.

Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol* 63:29-60.

Gash DM, Zhang Z, Ovadia A, Cass WA, Yi A, Simmerman L, Russell D, Martin D, Lapchak PA, Collins F, Hoffer BJ, Gerhardt GA. 1996. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 380:252-255.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501.

Gibbs RB. 1999. Treatment with estrogen and progesterone affects relative levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in different regions of the adult rat brain. *Brain Res* 844:20-27.

Graham DG, Tiffany SM, Bell WR, Jr., Gutknecht WF. 1978. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol* 14:644-653.

Granholt AC, Mott JL, Bowenkamp K, Eken S, Henry S, Hoffer BJ, Lapchak PA, Palmer MR, van Horne C, Gerhardt GA. 1997. Glial cell line-derived neurotrophic factor improves survival of ventral mesencephalic grafts to the 6-hydroxydopamine lesioned striatum. *Exp Brain Res* 116:29-38.

Grattan DR, Rocca MS, Strauss KI, Sagrillo CA, Selmánoff M, McCarthy MM. 1996. GABAergic neuronal activity and mRNA levels for both forms of glutamic acid decarboxylase (GAD65 and GAD67) are reduced in the diagonal band of Broca during the afternoon of proestrus. *Brain Res* 733:46-55.

Green PS, Gordon K, Simpkins JW. 1997. Phenolic A ring requirement for the neuroprotective effects of steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 63:229-235.

Green PS, Simpkins JW. 2000. Neuroprotective effects of estrogens: potential mechanisms of action. *Int J Dev Neurosci* 18:347-358.

Harding, CF. 2004. Hormonal modulation of singing: hormonal modulation of songbird brain and singing behavior. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1016:524-539.

Hawkins V, Shen Q, Chiueh CC. 1999. Kynostatin and 17 β -estradiol prevent the apoptotic death of human neuroblastoma cells exposed to HIV-1 protease. *J Biomed Sci* 6:433-438.

Hefti F, Melamed E. 1981. Dopamine release in rat striatum after administration of L-dopa as studied with in vivo electrochemistry. *Brain Res* 225:333-346.

Herrera AJ, Tomas-Camardiel M, Venero JL, Cano J, Machado A. 2005. Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neural Transm* 112:111-119.

Herrero MT, Luquin MR, Obeso JA. 1992. [Experimental model of Parkinson disease: mechanisms and anatomo- pathological characteristics of MPTP neurotoxicity]. *Arch Neurobiol (Madr)* 55:175-182.

Hirsch EC. 2000. Nigrostriatal system plasticity in Parkinson's disease: effect of dopaminergic denervation and treatment. *Ann Neurol* 47:S115-120; discussion S120-111.

Ivanova T, Beyer C. 2003. Estrogen regulates tyrosine hydroxylase expression in the neonate mouse midbrain. *J Neurobiol* 54:638-647.

Ivanova T, Karolczak M, Beyer C. 2002. Estradiol stimulates GDNF expression in developing hypothalamic neurons. *Endocrinology* 143:3175-3178.

Ivanova T, Kupperts E, Engele J, Beyer C. 2001. Estrogen stimulates BDNF expression in embryonic mouse midbrain neurons through a membrane-mediated and calcium-dependent mechanism. *J Neurosci Res* 66:221-230.

Jellinger K, Linert L, Kienzl E, Herlinger E, Youdim MB. 1995. Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 46:297-314.

Jenner P. 1998. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 13 Suppl 1:24-34.

Jezierski MK, Sohrabji F. 2000. Region- and peptide-specific regulation of the neurotrophins by estrogen. *Brain Res Mol Brain Res* 85:77-84.

Jezierski MK, Sohrabji F. 2003. Estrogen enhances retrograde transport of brain-derived neurotrophic factor in the rodent forebrain. *Endocrinology* 144:5022-5029.

Kandel, ER, Schwartz, JH e Jessell, TM. 2003. *Princípios da neurociência*, 4ª edição. Brasil: Manole 854:1055

Kholodilov N, Yarygina O, Oo TF, Zhang H, Sulzer D, Dauer W, Burke RE. 2004. Regulation of the development of mesencephalic dopaminergic systems by the selective expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in their targets. *J Neurosci* 24:3136-3146.

Kim YJ, Lee CJ, Lee U, Yoo YM. 2005. Tamoxifen-induced cell death and expression of neurotrophic factors in cultured C6 glioma cells. *J Neurooncol* 71:121-125.

Kim YS, Kim SS, Cho JJ, Choi DH, Hwang O, Shin DH, Chun HS, Beal MF, Joh TH. 2005. Matrix metalloproteinase-3: a novel signaling proteinase from apoptotic neuronal cells that activates microglia. *J Neurosci* 25:3701-3711.

Kipp M, Karakaya S, Pawlak J, Araujo-Wright G, Arnold S, Beyer C. 2006. Estrogen and the development and protection of nigrostriatal dopaminergic neurons: Concerted action of a multitude of signals, protective molecules, and growth factors. *Front Neuroendocrinol* 27:376-390.

Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG. 2001. Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells. *Free Radic Biol Med* 31:1473-1485.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-870.

Lang AE, Obeso JA. 2004. Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *Lancet Neurol* 3:309-316.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. 1993. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 260:1130-1132.

Lin LF, Zhang TJ, Collins F, Armes LG. 1994. Purification and initial characterization of rat B49 glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 63:758-768.

Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmer E, Kokaia M. 1994. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci* 17:490-496.

Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC. 1997. Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 48:1583-1588.

Liu H, Iacono RP, Szalay AA. 2001. Detection of GDNF secretion in glial cell culture and from transformed cell implants in the brains of live animals. *Mol Genet Genomics* 266:614-623.

Liu Y, Fowler CD, Young LJ, Yan Q, Insel TR, Wang Z. 2001. Expression and estrogen regulation of brain-derived neurotrophic factor gene and protein in the forebrain of female prairie voles. *J Comp Neurol* 433:499-514.

Liu X, Fan XL, Zhao Y, Luo GR, Li XP, Li R, Le WD. 2005. Estrogen provides neuroprotection against activated microglia-induced dopaminergic neuronal injury through both estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta in microglia. *J Neurosci Res* 81:653-665.

Lotharius J, Dugan LL, O'Malley KL. 1999. Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J Neurosci* 19:1284-1293.

Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS, Cooper AJ. 1994. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem* 62:45-53.

Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. 2002. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 277:1641-1644.

Matsura T, Kai M, Fujii Y, Ito H, Yamada K. 1999. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in HL-60 cells requires caspase-3 activation. *Free Radic Res* 30:73-83.

Mermelstein PG, Becker JB, Surmeier DJ. 1996. Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J Neurosci* 16:595-604.

Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, Pear L, Wilkinson HA, Hayashi S, Pfaff DW, Ogawa S, Rohrer SP, Schaeffer JM, McEwen BS, Alves SE. 2003. Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 144:2055-2067.

Morale MC, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G, Rocchitta G, Desole MS, Miele E, Marchetti B. 2006. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 138:869-878.

Murphy DD, Cole NB, Segal M. 1998. Brain-derived neurotrophic factor mediates estradiol-induced dendritic spine formation in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11412-11417.

Nakamizo T, Urushitani M, Inoue R, Shinohara A, Sawada H, Honda K, Kihara T, Akaike A, Shimohama S. 2000. Protection of cultured spinal motor neurons by estradiol. *Neuroreport* 11:3493-3497.

Nass R, Blakely RD. 2003. The *Caenorhabditis elegans* dopaminergic system: opportunities for insights into dopamine transport and neurodegeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:521-544.

Newhouse K, Hsuan SL, Chang SH, Cai B, Wang Y, Xia Z. 2004. Rotenone-induced apoptosis is mediated by p38 and JNK MAP kinases in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Toxicol Sci* 79:137-146.

Palumbo A, Napolitano A, Barone P, d'Ischia M. 1999. Nitrite- and peroxide-dependent oxidation pathways of dopamine: 6-nitrodopamine and 6-hydroxydopamine formation as potential contributory mechanisms of oxidative stress- and nitric oxide-induced neurotoxicity in neuronal degeneration. *Chem Res Toxicol* 12:1213-1222.

Pan Y, Anthony M, Clarkson TB. 1999. Evidence for up-regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA by soy phytoestrogens in the frontal cortex of retired breeder female rats. *Neurosci Lett* 261:17-20.

Panickar KS, Guan G, King MA, Rajakumar G, Simpkins JW. 1997. 17beta-estradiol attenuates CREB decline in the rat hippocampus following seizure. *J Neurobiol* 33:961-967.

Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF. 2003. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell* 113:867-879.

Pardo B, Mena MA, Casarejos MJ, Paino CL, De Yebenes JG. 1995. Toxic effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures: protection with antioxidants. *Brain Res* 682:133-143.

Perry TL, Godin DV, Hansen S. 1982. Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci Lett* 33:305-310.

Pietras RJ, Szego CM. 1977. Specific binding sites for oestrogen at the outer surface of isolated endometrial cells. *Nature* 265:69-72.

Pina Serra M, Quartu M, Ambu R, Follesa P, Del Fiacco M. 2002. Immunohistochemical localization of GDNF in the human hippocampal formation from prenatal life to adulthood. *Brain Res* 928:138-146.

Platania P, Seminara G, Aronica E, Troost D, Vincenza Catania M, Angela Sortino M. 2005. 17beta-estradiol rescues spinal motoneurons from AMPA-induced toxicity: a role for glial cells. *Neurobiol Dis* 20:461-470.

Poulter MO, Payne KB, Steiner JP. 2004. Neuroimmunophilins: a novel drug therapy for the reversal of neurodegenerative disease? *Neuroscience* 128:1-6.

Poulter MO, Payne KB, Steiner JP. 2004. Neuroimmunophilins: a novel drug therapy for the reversal of neurodegenerative disease? *Neuroscience* 128:1-6.

Przedborski S. 2005. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 11 Suppl 1:S3-7.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. 1991. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 266:4244-4250.

Quinn N, Parkes D, Janota I, Marsden CD. 1986. Preservation of the substantia nigra and locus coeruleus in a patient receiving levodopa (2 kg) plus decarboxylase inhibitor over a four-year period. *Mov Disord* 1:65-68.

Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA. 1989. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5178-5182.

Rodrigues RWP, Gomide VC, Chadi G. 2003. Striatal injection of 6-OHDA induces retrograde degeneration and glial activation in the nigrostriatal pathway. *Acta cirúrgica brasileira* 18:272-282

Rosenblad C, Martinez-Serrano A, Bjorklund A. 1998. Intrastriatal glial cell line-derived neurotrophic factor promotes sprouting of spared nigrostriatal dopaminergic afferents and induces recovery of function in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 82:129-137.

Ross CA, Poirier MA. 2004. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10 Suppl:S10-17.

Saavedra A, Baltazar G, Carvalho CM, Duarte EP. 2005. GDNF modulates HO-1 expression in substantia nigra postnatal cell cultures. *Free Radic Biol Med* 39:1611-1619.

Saavedra A, Baltazar G, Santos P, Carvalho CM, Duarte EP. 2006. Selective injury to dopaminergic neurons up-regulates GDNF in substantia nigra postnatal cell cultures: role of neuron-glia crosstalk. *Neurobiol Dis* 23:533-542.

Stryer L. 1987. *Bioquímica*. Guanabara Koogan, 3ª edição; 468.

Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Akaike A, Shimohama S. 1998. Estradiol protects mesencephalic dopaminergic neurons from oxidative stress-induced neuronal death. *J Neurosci Res* 54:707-719.

Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Honda K, Nakanishi M, Akaike A, Shimohama S. 2000. Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. *Faseb J* 14:1202-1214.

Sawada H, Ibi M, Kihara T, Urushitani M, Nakanishi M, Akaike A, Shimohama S. 2000. Neuroprotective mechanism of glial cell line-derived neurotrophic factor in mesencephalic neurons. *J Neurochem* 74:1175-1184.

Sawada H, Kawamura T, Shimohama S, Akaike A, Kimura J. 1996a. Different mechanisms of glutamate-induced neuronal death between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rat mesencephalic culture. *J Neurosci Res* 43:503-510.

Sawada H, Shimohama S, Kawamura T, Akaike A, Kitamura Y, Taniguchi T, Kimura J. 1996. Mechanism of resistance to NO-induced neurotoxicity in cultured rat dopaminergic neurons. *J Neurosci Res* 46:509-518.

Schaar DG, Sieber BA, Dreyfus CF, Black IB. 1993. Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. *Exp Neurol* 124:368-371.

Schmidt-Kastner R, Tomac A, Hoffer B, Bektesh S, Rosenzweig B, Olson L. 1994. Glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA upregulation in striatum and cortical areas after pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 26:325-330.

Segura Aguilar J, Kostrzewa RM. 2004. Neurotoxins and neurotoxic species implicated in neurodegeneration. *Neurotox Res* 6:615-630.

Sengpiel B, Preis E, Kriegstein J, Prehn JH. 1998. NMDA-induced superoxide production and neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons: role of mitochondria. *Eur J Neurosci* 10:1903-1910.

Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388:507-525.

Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. 1998. Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport* 9:2565-2568.

Smith MA, Zhang LX, Lyons WE, Mamounas LA. 1997. Anterograde transport of endogenous brain-derived neurotrophic factor in hippocampal mossy fibers. *Neuroreport* 8:1829-1834.

Sohrabji F, Greene LA, Miranda RC, Toran-Allerand CD. 1994. Reciprocal regulation of estrogen and NGF receptors by their ligands in PC12 cells. *J Neurobiol* 25:974-988.

Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD. 1994. Estrogen differentially regulates estrogen and nerve growth factor receptor mRNAs in adult sensory neurons. *J Neurosci* 14:459-471.

Sohrabji F, Miranda RC, Toran-Allerand CD. 1995. Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11110-11114.

Solum DT, Handa RJ. 2002. Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus. *J Neurosci* 22:2650-2659.

Sriram K, Matheson JM, Benkovic SA, Miller DB, Luster MI, O'Callaghan JP. 2006. Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF-alpha. *Faseb J* 20:670-682.

Suttner DM, Dennerly PA. 1999. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *Faseb J* 13:1800-1809.

Takahashi M. 2001. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 12:361-373.

Teismann P, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Wu DC, Marks D, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S. 2003. Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord* 18:121-129.

Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA. 2000. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci* 20:9207-9214.

Thoenen H. 1995. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270:593-598.

Thoenen H, Barde YA, Davies AM, Johnson JE. 1987. Neurotrophic factors and neuronal death. *Ciba Found Symp* 126:82-95.

Thompson TL. 1999. Attenuation of dopamine uptake in vivo following priming with estradiol benzoate. *Brain Res* 834:164-167.

Thompson TL MR. 1994. Estrogen regulation of dopamine release in the nucleus accumbens: genomic and nongenomic-mediated effects. *J Neurochem* 229:145-148.

Tomac A, Widenfalk J, Lin LF, Kohno T, Ebendal T, Hoffer BJ, Olson L. 1995. Retrograde axonal transport of glial cell line-derived neurotrophic factor in the adult nigrostriatal system suggests a trophic role in the adult. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:8274-8278.

Toran-Allerand CD. 1984. On the genesis of sexual differentiation of the general nervous system: morphogenetic consequences of steroidal exposure and possible role of alpha-fetoprotein. *Prog Brain Res* 61:63-98.

Toran-Allerand CD, Guan X, MacLusky NJ, Horvath TL, Diano S, Singh M, Connolly ES Jr, Nethrapalli IS, Tinnikov AA. 2002. ER-X: a novel, plasma membrane-associated, putative estrogen receptor that is regulated during development and after ischemic brain injury. *J Neurosci* 1;22(19):8391-401.

Tripanichkul W, Sripanichkulchai K, Finkelstein DI. 2006. Estrogen down-regulates glial activation in male mice following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication. *Brain Res* 1084:28-37.

Trupp M, Ryden M, Jornvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibanez CF. 1995. Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol* 130:137-148.

Tucker KL, Meyer M, Barde YA. 2001. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci* 4:29-37.

Uversky VN. 2004. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell Tissue Res* 318:225-241.

Vegeto E, Bonincontro C, Pollio G, Sala A, Viappiani S, Nardi F, Brusadelli A, Viviani B, Ciana P, Maggi A. 2001. Estrogen prevents the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in microglia. *J Neurosci* 21:1809-1818.

Vicario-Abejon C, Collin C, McKay RD, Segal M. 1998. Neurotrophins induce formation of functional excitatory and inhibitory synapses between cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 18:7256-7271.

Vila M, Przedborski S. 2004. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med* 10 Suppl:S58-62.

Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellerin L. 2003. Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37:275-286.

Wallace DR, Dodson S, Nath A, Booze RM. 2006. Estrogen attenuates gp120- and tat1-72-induced oxidative stress and prevents loss of dopamine transporter function. *Synapse* 59:51-60.

Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu EE, Akwa Y. 2002. Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5138-5143.

Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. 1994. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5212-5216.

Wong YW, Sia GM, Too HP. 2002. Quantification of mouse glial cell-line derived neurotrophic factor family receptor alpha 2 alternatively spliced isoforms by real time detection PCR using SYBR Green I. *Neurosci Lett* 320:141-145.

Wood TK, McDermott KW, Sullivan AM. 2005. Differential effects of growth/differentiation factor 5 and glial cell line-derived neurotrophic factor on dopaminergic neurons and astroglia in cultures of embryonic rat midbrain. *J Neurosci Res* 80:759-766.

Yu T, Scully S, Yu Y, Fox GM, Jing S, Zhou R. 1998. Expression of GDNF family receptor components during development: implications in the mechanisms of interaction. *J Neurosci* 18:4684-4696.

Zeng BY, Pearce RK, MacKenzie GM, Jenner P. 2001. Chronic high dose L-dopa treatment does not alter the levels of dopamine D-1, D-2 or D-3 receptor in the striatum of normal monkeys: an autoradiographic study. *J Neural Transm* 108:925-941.